

Aus der  
Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Danilo Fliser

---

# **Hämodialyse-induzierte transiente Monozytopenie als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

**2011**

vorgelegt von Maren Ziegelin



---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

INHALTSVERZEICHNIS .....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	5
1 ZUSAMMENFASSUNG .....	7
1.1 Deutsche Zusammenfassung .....	7
1.2 Summary.....	9
2 EINLEITUNG.....	11
2.1 Mikroinflammation und kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz .....	11
2.2 Monozytenheterogenität .....	13
2.3 Zielsetzung der Arbeit .....	15
3 MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1 Materialien.....	17
3.2 Methoden .....	17
3.2.1 Klinischer Teil .....	17
3.2.2 Immunologisch-experimenteller Teil .....	20
3.3 Datenverarbeitung und statistische Auswertung .....	24
4 ERGEBNISSE .....	26
5 DISKUSSION.....	39
6 LITERATURVERZEICHNIS .....	44
7 DANKSAGUNG .....	50
8 PUBLIKATION.....	51
9 ANHANG .....	52

9.1	Materialien.....	52
9.1.1	Geräte.....	52
9.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	53
9.1.3	Substanzen .....	53
9.1.4	Puffer und Medien .....	54
9.1.5	Monoklonale Antikörper .....	54
9.2	Tabellenverzeichnis .....	55
9.3	Abbildungsverzeichnis .....	56
9.4	Fragebogen .....	57
10	CURRICULUM VITAE.....	64

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BD	Becton Dickinson
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“)
CD	Cluster of Differentiation
CI	Konfidenzintervall („Confidence Interval“)
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung („Cardiovascular Disease“)
d.h.	das heißt
dest.	Destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum („Foetal Calf Serum“)
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung („Forward Scatter“)
FL	Fluoreszenzdetektoren
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IL	Interleukin
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
n	Anzahl
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („Phosphat Buffered Saline“)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
rpm	Umdrehungen pro Minute („Rounds Per Minute“)
RR	Riva-Rocci-Blutdruckmessung
SD	Standardabweichung („Standard Deviation“)
SSC	Seitwärtsstreuung („Sideward Scatter“)
Tab.	Tabelle
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Tab. 1: Abkürzungsverzeichnis

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

---

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

---

Hintergrund:

Hämodialysebehandlungen mit bioinkompatiblen Membranen führten in der Vergangenheit zu einer passageren Aktivierung von Leukozyten und ihrer Adhäsion an Endothelien. Dies resultierte in einem vorübergehenden Abfall von Leukozytenzellzahlen während der Dialysebehandlung. Nach Einführung biokompatibler Membranen zeigen nur noch CD16+ (d.h. CD14++CD16+ und CD14+CD16+) Monozyten einen relevanten intradialytischen Abfall. Da die prognostische Bedeutung eines solchen intradialytischen Monozytensturzes unklar war, untersuchte die vorliegende Arbeit einen starken intradialytischen CD16+ Monozytenabfall als Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse.

Methodik:

Am Anfang und 10 Minuten nach Beginn einer Hämodialysebehandlung wurden Leukozyten-, Lymphozyten- und Monozytensubpopulationen bei 70 Patienten untersucht. Die Monozytenheterogenität wurde im Vollblut durchflusszytometrisch mittels der Oberflächenantigene CD14 und CD16 analysiert, um CD14++CD16-, CD14++CD16+ und CD14+CD16+ Monozyten zu differenzieren.

Die Patienten wurden nach dem intradialytischen Abfall der CD14++CD16+ Monozyten in zwei Gruppen stratifiziert:

Starker Zellsturz:

Abfall der Zellen innerhalb 10 Minuten um mehr als 50 % der Ausgangswerte

Geringer Zellsturz:

Abfall der Zellen innerhalb 10 Minuten um weniger als 50 % der Ausgangswerte

Es erfolgte eine Nachbeobachtung der Patienten über  $42 \pm 2$  Monate. Prädefinierte Endpunkte waren eintretende kardiovaskuläre Ereignisse und Todesfälle.

Ergebnisse:

In Einklang mit früheren Arbeiten zeigen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten gegenüber anderen Leukozytensubpopulationen den deutlichsten intradialytischen Zellzahlabfall. Bei Patienten mit einem geringen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytensturz traten im Vergleich zu Patienten mit einem starken Sturz vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse auf. In einer multivariaten Analyse war der stärkste unabhängige Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse ein geringer Sturz der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (Hazard Ratio 2,405 [CI 1,192-4,854]).

Schlussfolgerung:

Diese Daten widerlegen die Annahme, dass ein deutlicher intradialytischer Abfall von CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten prognostisch ungünstig ist. Stattdessen könnte ein geringerer Sturz der Zellzahlen dieser Subpopulation eine CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytendysfunktion widerspiegeln, welche sich in einer inadäquaten Migrationsreaktion auf einem immunologischen Stimulus durch Dialysemembranen und Dialyseschlauchsysteme zeigt.



## 1.2 Summary

---

### Background:

Haemodialysis with bioincompatible membranes led to transient leukocyte activation and intradialytic leukopenia due to endothelial adherence. After the introduction of biocompatible membranes, only CD16<sup>+</sup> (i.e. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes show an impressive transient intradialytic decrease. Presently, it is unclear whether this CD16<sup>+</sup> monocyte drop is detrimental. We investigated whether a prominent intradialytic decrease of CD16<sup>+</sup> monocytes predicts future cardiovascular events.

### Methods:

We measured leukocyte, lymphocyte and monocyte subsets in 70 patients before and 10 minutes after haemodialysis initiation. Monocyte heterogeneity was analyzed while using monoclonal antibodies against CD14 and CD16 in a whole blood assay and then determined by flow cytometry. Subpopulations of CD14<sup>++</sup>16<sup>-</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes were distinguished.

Patients were stratified by their intradialytic CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte drop:

#### Predefined major drop:

Decline of cell counts at 10 minutes to < 50 % of predialytic values

#### Predefined minor drop:

Decline of cell counts at 10 minutes to > 50 % of predialytic values

Patients were followed up for  $42 \pm 2$  months. Predefined endpoints were cardiovascular events and death.

Results:

In line with previous studies, counts of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes showed a more pronounced intradialytic decline than all other leukocyte subsets measured. Patients with a minor CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte drop had more cardiovascular events than patients with a major drop. In multivariate analysis, a minor CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte drop was the strongest independent predictor of future cardiovascular events (hazard ratio 2.405 [CI 1.192-4.854]).

Conclusions:

These data refute the assumption that a prominent intradialytic decrease of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes is detrimental. Instead, a minor cell drop could mirror CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte dysfunction, with inadequate migratory reaction towards an immunologic stimulus posed by membrane and tubing contact.

## 2 EINLEITUNG

---

### 2.1 Mikroinflammation und kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

---

Die Atherogenese wurde bis in das letzte Jahrzehnt des zwanzigsten Jahrhunderts meist als passive Gefäßreaktion auf das Einwirken von traditionellen Risikofaktoren - wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Übergewicht und Nikotinkonsum - mit nachfolgender Lipidakkumulation in der Gefäßwand und progredienter Plaquebildung betrachtet. In den letzten zwei Jahrzehnten gewann jedoch die Erkenntnis, dass es sich bei der Atherosklerose um eine aktive und primär inflammatorisch bedingte Erkrankung handelt, zunehmende Anerkennung (Ross, 1999).

So konnten chronisch entzündliche Erkrankungen, wie Lupus erythemathodes, rheumatoide Arthritis und HIV-Infektion in mehreren Studien mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert werden (Asanuma et al., 2003; Fischer et al., 2004; Hak et al., 2009; Lo et al., 2010).

Selbst bei Patienten ohne klinisch manifeste Inflammationserkrankung wurde bereits 1997 belegt, dass asymptomatisch erhöhte CRP-Werte unabhängige Prädiktoren für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse waren (Ridker et al., 1997). Zahlreiche nachfolgende Kohortenstudien unterstützen diese Beobachtung (Hemingway et al., 2010).

Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung weisen eine deutlich beschleunigte Atherosklerose und eine erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse auf (Go et al., 2004, de Jager et al., 2009). In Deutschland verstarben im Jahr 2006 über 50 % der Dialysepatienten aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse ([www.bundesverband-niere.de](http://www.bundesverband-niere.de), Jahresbericht QuaSi Niere 2006-2007).

Mehrere bei Dialysepatienten durchgeführte Studien bestätigen die in der Allgemeinbevölkerung vorbeschriebene Assoziation von chronischer Inflammation und

kardiovaskulären Erkrankungen. Erhöhte Plasmawerte von C-reaktivem Protein (Zimmermann et al., 1999; Tripepi et al., 2005) und IL-6 (Bologa et al., 1998; Barreto et al., 2010) als Marker einer systemischen Inflammation bei Dialysepatienten werden mit kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. Da die chronische Inflammation in der Leber eine Akute-Phase-Antwort induziert, welche in einer verminderten hepatischen Albuminsynthese und nachfolgender Hypoalbuminämie bei Hämodialysepatienten mündet (Kaysen et al., 2003), kann die Hypoalbuminämie als weiteres Zeichen einer chronischen Inflammation betrachtet werden, welche einen zusätzlichen Prädiktor der Mortalität von Dialysepatienten darstellt (Lowrie et al., 1990; Arıkan et al., 2009). Dialysepatienten mit gleichzeitig erhöhtem C-reaktivem Protein, erhöhten proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und erniedrigten Albuminwerten weisen das höchste Risiko bezüglich der Mortalität und fataler kardiovaskulärer Ereignisse (Panichi et al., 2008).

Die chronische Mikroinflammation bei Niereninsuffizienz erscheint als komplexes Zusammenspiel von veränderter renaler Metabolisierung und Exkretion der erkrankten Nieren.

Es wird zunächst allgemein angenommen, dass die verminderte Elimination von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 (Girndt et al., 1995; Girndt et al., 1998) zu der persistierenden Mikroinflammation und zu den Veränderungen der Immunfunktion beitragen (Stenvinkel et al., 2003), da die Nieren eine elementare Rolle in der Elimination von Zytokinen spielen (Kudo et al., 1990). Gleichzeitig aktiviert die Urämie per se die Produktion von Zytokinen (Stenvinkel et al., 2005) und führt zu einer progredienten Triggerung der Mikroinflammation, die sich bereits bei niereninsuffizienten Patienten zeigt, welche nicht dialysepflichtig sind (Stenvinkel et al., 1999).

Zusätzlich kann die transmembrane Passage von bakteriellen Endotoxinen aus dem Dialysat während einer Dialysebehandlung zur Progression der Inflammation beitragen (Schindler et al., 2004).

Neben der Zunahme proinflammatorischer Zytokine steht eine Monozytenfunktionsstörung (Meuer et al., 1987) im Mittelpunkt der Mikroinflammation des Dialysepatienten, welche durch veränderte Zytokinbildung und Verschiebungen im Verhältnis der Monozytensubpopulationen (Nockher et al., 1998) charakterisiert sind.

## 2.2 Monozytenheterogenität

---

Monozyten sind mononukleäre Zellen, welche aus myeloischen Stammzellen abstammen und sich im Knochenmark entwickeln. Der Monozytenanteil im peripheren Blut beträgt ungefähr 3-10 % der Gesamtleukozytenzellen.

Die Hauptaufgabe der zirkulierenden Monozyten im peripheren Blut ist die zellvermittelte Immunantwort. Zirkulierende Monozyten wandern in verschiedene Gewebe aus und erfahren dort eine weitere Differenzierung in Makrophagen, welche durch Phagozytose fremder Organismen an der Immunantwort beteiligt sind, und in Dendritische Zellen, welche an der Antigenpräsentierung für T-Zellen beteiligt sind. Weiterhin sind Monozyten an der Immunadaptation durch Sezernierung verschiedene Zytokine beteiligt (Hume, 2006).

Die Phänotypisierung der im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten erfolgt anhand ihrer Oberflächenantigene, welche entsprechend der internationalen Klassifikation als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet werden. Monozyten werden gewöhnlich über die Expression des multifunktionalen Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors CD14 identifiziert. Gleichzeitig exprimiert eine kleine Subpopulation der Monozyten zusätzlich den niedrig-affinen Immunglobulin-G-FC $\gamma$ III-Rezeptor CD16 (Passlick et al., 1989), diese Population wird als CD16<sup>+</sup> Monozyten zusammengefasst. Die klassischen Monozyten weisen eine hohe Expression von CD14, jedoch kein CD16 auf und werden CD16<sup>-</sup> Monozyten genannt. Die CD16<sup>+</sup> Monozyten lassen sich von den CD16<sup>-</sup> Monozyten morphologisch kaum unterscheiden, sie sind etwas kleiner und besitzen eine stärkere Granularität (Passlick et al., 1989), jedoch zeigen sie unterschiedliche Expressionsmuster ihrer Oberflächenantigene und Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel eine ungefähr zwei- bis vierfach erhöhte Expression des MHC-II-Moleküls (Ziegler-Heitbrock et al., 1993; Ziegler-Heitbrock et al., 1996; Ancuta et al., 2003). CD16<sup>+</sup> Monozyten weisen Merkmale von Gewebsmakrophagen auf, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei dieser Subpopulation um eine reifere Monozytenform handelt (Ziegler-Heitbrock et al., 1993).

Innerhalb der CD16<sup>+</sup> Monozyten werden weiterhin CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten differenziert (Ancuta et al., 2003), sodass aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters von CD14 und CD16 drei

Monozytensubpopulationen unterschieden werden müssen: CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). In der Literatur wird die Differenzierung zwischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten jedoch inkonsistent benutzt, sodass wir im folgenden CD16<sup>+</sup> Monozyten als Summe der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten definieren. Die beiden Subpopulationen der CD16<sup>+</sup> Monozyten machen bis zu 10-20 % der zirkulierenden Monozyten aus (Ziegler-Heitbrock et al., 2007). Nach Stimulation mit Lipopolysaccharid produzieren die CD16<sup>+</sup> Monozyten im Vergleich mit CD16<sup>-</sup> Monozyten weniger antiinflammatorisches IL-10 (Frankenberger et al., 1996), dafür aber vermehrt proinflammatorisches TNF- $\alpha$  (Belge et al., 2002; Kim et al., 2011). Nachdem CD16<sup>+</sup> Monozyten zudem bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie zum Beispiel HIV, rheumatoider Arthritis oder Sepsis, vermehrt nachgewiesen werden konnten (Thieblemont et al., 1995; Baeten et al., 2000; Fingerle et al., 1993; Skrzeczynska et al., 2002), und CD16<sup>+</sup> Monozyten im Weiteren eine hohe endotheliale Affinität aufweisen (Steppich et al., 2000), werden CD16<sup>+</sup> Monozyten traditionell als proinflammatorische Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al., 2007) betrachtet.

Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen weisen im Rahmen ihrer persistierenden Mikroinflammation stark erhöhte CD16<sup>+</sup> Monozytenzellzahlen auf (Nockher et al., 1998; Saionji et al., 2001).

Aufgrund ihrer proinflammatorischen Eigenschaften, und angesichts ihrer hohen endothelialen Affinität wird eine zentrale Rolle der CD16<sup>+</sup> Monozyten in der Entstehung der Atherosklerose diskutiert (Ziegler-Heitbrock et al., 2007; Schlitt et al., 2004). Daher könnte die Zunahme der CD16<sup>+</sup> Monozyten bei chronischen Nierenerkrankungen zu der enorm erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beitragen. Im Einklang damit identifizierte unsere Arbeitsgruppe erhöhte Zellzahlen der CD16<sup>+</sup> Monozyten als Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten (Heine et al., 2008; Ulrich et al., 2010) und bei chronisch nierenkranken Menschen vor Einsetzen der Dialysepflichtigkeit (Rogacev et al., 2011).

Seit Beginn der Hämodialysetherapie sind eine Leukozytenaktivierung und ein temporärer Abfall der zirkulierenden Leukozyten während der Hämodialysebehandlung bekannt

(Kaplow et al., 1968). Dieser Sturz der absoluten Leukozytenzellzahlen tritt vor allem bei Verwendung bioinkompatibler Membranen auf, welche das Komplementsystem über den alternativen Signalweg aktivieren (Craddock et al., 1977), wodurch eine transiente Adhäsion insbesondere von aktivierten Granulozyten an Endothelzellen der Pulmonalisstrombahn auftritt (Toren et al., 1970; Girndt et al., 1999).

Nach Einführung von biokompatiblen Membranen zeigen CD16+ Monozyten als einzige Subpopulation der Leukozyten einen ausgeprägten transienten intradialytischen Abfall. Ungefähr die Hälfte aller CD16+ Monozyten verschwindet innerhalb von 10 Minuten nach Beginn der Hämodialysebehandlung kurzzeitig aus dem zirkulierenden Blut, um am Ende der Hämodialyse wieder in die Blutzirkulation zurückzukehren (Sester et al., 2001; Nockher et al., 2001).

Das intradialytische Schicksal der CD16+ Monozyten während der Dialysebehandlung mit biokompatiblen Membranen ist unzureichend entschlüsselt. In Analogie zu den Granulozyten während der Hämodialyse mit bioinkompatiblen Membranen wird angenommen, dass sich ein Teil der CD16+ Monozyten an das Endothel der pulmonalen Blutgefäße anlagert. Ein anderer Anteil der CD16+ Monozyten könnte sich an entstehende atherosklerotische Läsionen und atherosklerotische Plaques des Gefäßsystems anlagern und dort durch Auswanderung in den Plaque und lokale Produktion von inflammatorischen Zytokinen zu einer Progression der Plaquebildung beitragen.

Falls diese Hypothese korrekt ist, sollten Patienten mit einem ausgeprägten intradialytischen Sturz der CD16+ Monozytenzahlen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweisen.

### **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

---

Die Beziehung zwischen dem intradialytischen Sturz der CD16+ Monozytenzellzahlen und der Prävalenz und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen bei Hämodialysepatienten wurde bislang nicht untersucht. Aufgrund unserer Hypothese, dass ein ausgeprägter intradialytischer Abfall der CD16+ Monozyten mit einer verstärkten

Adhäsion proinflammatorischer Monozyten an prävalente atherosklerotische Läsionen einhergehe, welche in einer Extravasation dieser Zellen in den Plaque und daher in einer weiteren Progression der Atherogenese münde, analysierten wir, ob Hämodialysepatienten mit einem deutlichen intradialytischen Abfall der CD16+ Monozytenzahlen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufzeigen.

Da bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte Anzahl von CD16+ Monozyten zu Beginn einer Dialysetherapie als ein kardiovaskulärer Risikofaktor charakterisiert werden konnte (Heine et al., 2008, Ulrich et al., 2010), postulieren wir, dass diejenigen Hämodialysepatienten das höchste Risiko zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse aufweisen, welche zu Beginn einer Hämodialysebehandlung erhöhte CD16+ Monozytenzahlen aufweisen und während der Dialyse einen starken Sturz der Zellzahlen dieser Monozytensubpopulation zeigen.

Hypothese:

Eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen CD16+ Monozyten vor Beginn einer Hämodialysetherapie und ein ausgeprägter intradialytischer Abfall dieser proinflammatorischen CD16+ Monozyten sind Prädiktoren zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse.



## **3 MATERIAL UND METHODEN**

---

### **3.1 Materialien**

---

Die verwendeten Materialien dieser Arbeit sind im Anhang unter Kapitel 9.1 aufgeführt.

### **3.2 Methoden**

---

#### **3.2.1 Klinischer Teil**

##### **3.2.1.1 Studiendesign**

Der immunologisch-experimentelle Teil dieser prospektiven Kohortenstudie wurde im Zeitraum von März bis September 2005 durchgeführt. Dabei wurden 70 Patienten (31 Frauen und 39 Männer) aus der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten - des Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert, welche sich aufgrund einer prävalenten chronischen Nierenerkrankung im Stadium 5 in einer Hämodialysebehandlung befanden. Die Einwilligung erfolgte nach mündlicher Aufklärung der Probanden. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Ausgeschlossen wurden Patienten, welche ein unbehandeltes oder nicht vollständig ausgeheiltes Malignom, einen akuten fiebrigen Infekt oder eine aktive systemische Autoimmunerkrankung zum Untersuchungszeitpunkt aufwiesen. Patienten, die sich in stationärer Behandlung befanden, wurden ebenso ausgeschlossen. Die Hämodialyse wurde mittels Bikarbonatdialysat und folgenden Polyamid- oder Polysulphonfiltern durchgeführt:

GFS 20 Plus-Alwall	Gambro, Hechingen, Deutschland
Polyflux 210 H	Gambro, Hechingen, Deutschland
F 8 HPS	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
F 60 S	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

Alle Studienteilnehmer wurden bis zum 31. Dezember 2008 hinsichtlich des Auftretens des kombinierten kardiovaskulären Endpunktes mittels standardisierter Datenbankanalyse nachverfolgt.

Als kombinierter kardiovaskulärer Endpunkt wurde vordefiniert das Auftreten von:

Myokardinfarkt

koronare Angioplastie, Stenting oder Bypasschirurgie

Schlaganfall mit länger als 24 Stunden andauernden Symptomen

Endarterektomie oder Stenting der Arteria carotis

nichttraumatische Extremitätenamputation oberhalb des Knöchels

peripher-arterielle Angioplastie, Stenting oder Bypasschirurgie

Tod des Patienten

Zusätzlich erfassten wir die Zeit bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund von infektiösen Erkrankungen. Im Falle einer allogenen Nierentransplantation wurden die Patienten bis zum Operationstag nachverfolgt.

### **3.2.1.2 Studienablauf**

Nach Einwilligung der Patienten zur Teilnahme an der Studie wurde ein standardisierter Fragebogen (basierend auf Rose, G. A.; Cardiovascular survey methods, 2nd. Ed. Geneva: WHO, 1982) beantwortet (siehe Kapitel 9.4), welcher die Ein- und Ausschlusskriterien überprüfte, die Eigen- und Familienanamnese hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen erhob, sowie Alkohol-, Nikotinkonsum und aktuelle Medikation erfasste. Parallel erfolgte ein Krankenaktenstudium zur Überprüfung der Komorbidität. Bei Diskrepanzen zwischen

anamnestischen Angaben und der Krankenakte wurden Originalbefunde angefordert.

Patienten mit einem ärztlich diagnostizierten und / oder selbst berichteten Diabetes mellitus, mit einer Spontan-Glukose  $>200$  mg/dl, und / oder mit antidiabetischer Medikation wurden als Diabetiker definiert.

Als Raucher wurden die Patienten definiert, welche aktuell rauchten oder weniger als einen Monat vor Studienbeginn den Nikotinkonsum beendet hatten.

Der Body-Mass-Index (BMI) wurde wie folgt berechnet: Körpergewicht [kg] / Körpergröße [m]<sup>2</sup>. Das Körpergewicht wurde jeweils vor und nach der Hämodialysebehandlung bestimmt. Für die Berechnung des BMI wurde das Körpergewicht nach der Hämodialyse zugrunde gelegt.

Vor Beginn und nach Abschluss der Hämodialysebehandlung wurden der systolische und diastolische arterielle Blutdruck ( $RR_{\text{systolisch}}$  und  $RR_{\text{diastolisch}}$ ) gemessen, der arterielle Mitteldruck war definiert als  $RR_{\text{diastolisch}} + (RR_{\text{systolisch}} - RR_{\text{diastolisch}}) / 3$ .

Prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen wurden bei den Patienten diagnostiziert, welche ein kardiovaskuläres Ereignis, wie oben definiert, in der Anamnese hatten.

Im Rahmen der Dialysebehandlung wurde den Patienten zu Studienzwecken vor Beginn der Hämodialyse zum Zeitpunkt  $t_1 = 0$  Minuten Blut entnommen. Eine zweite Blutentnahme erfolgte 10 Minuten nach Start der Hämodialyse ( $t_2 = 10$  Minuten), welche aus dem arteriellen Schenkel des Dialyseschlauchsystems erfolgte. Zum Zeitpunkt  $t_1 = 0$  Minuten wurde Blut für zwei 4,7 ml Lithium-Heparin-Gel Monovetten, eine 4,7 ml Serum-Gel Monovette und eine 2,7 ml Kalium-EDTA Monovette entnommen, nach 10 Minuten wurde Blut für eine 4,7 ml Lithium-Heparin-Gel Monovette und eine 2,7 ml Kalium-EDTA Monovette entnommen.

Die Blutproben für die Oberflächenfärbung wurden nach Entnahme sofort gekühlt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet, die übrigen Blutproben wurden in das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes gesendet. Dort wurden unter standardisierten Bedingungen ein Differentialblutbild, Glukose, C-reaktives Protein (CRP), Gesamtcholesterin, High Density Lipoprotein (HDL) Cholesterin, Low Density Lipoprotein (LDL) Cholesterin, Kalzium, Phosphat und Albumin bestimmt. Die Bestimmung der

Leukozyten- und Monozytenzahlen erfolgte bei allen Proben automatisiert im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes.

### **3.2.2 Immunologisch-experimenteller Teil**

Eine Differenzierung von Zellen des peripheren Blutes zur Phänotypisierung erfolgt mittels ihrer spezifischen Oberflächenantigene, welche anhand einer internationalen Klassifikation als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet werden.

Mit Hilfe von fluorochrom konjugierten monoklonalen Antikörpern werden die einzelnen Zellen immunophänotypisiert, durch die Durchflusszytometrie detektiert und gemessen.

Bei den angewendeten Oberflächenfärbeprotokollen handelt es sich um Standardmethoden, welche im immunologischen Labor der Klinik für Innere Medizin IV, etabliert sind.

Für die Immunophänotypisierung wurden die gewonnenen Blutproben direkt nach der Blutentnahme auf Eis gekühlt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet. Die Zentrifugation erfolgte bei allen Färbungen für 5 Minuten mit 1300 rpm bei auf 4 °C vorgekühlter Zentrifuge. Die Oberflächenfärbungen erfolgten jeweils simultan für  $t_1 = 0$  Minuten und  $t_2 = 10$  Minuten.

#### **3.2.2.1 Immunophänotypisierung der Monozytensubpopulationen**

Die zirkulierenden Monozyten wurden mittels vier monoklonaler Antikörper immunophänotypisiert. Zunächst wurden Monozyten einerseits aufgrund ihrer Granularität und ihrer CD86 Expression definiert. Eine Differenzierung der Monozytensubpopulationen erfolgt über die verschiedenen Expressionsmuster von CD14 (LPS-Rezeptor) und CD16 (FC $\gamma$ III-Rezeptor).

Es wurden jeweils 70  $\mu$ l Vollblut (aus der Lithium-Heparin Monovette) für die Oberflächenfärbung der Monozyten in FACS-Röhrchen pipettiert. Als erster Schritt erfolgte ein Waschvorgang, um das lösliche Angiotensin Converting Enzym (ACE) zu entfernen, dem Vollblut wurde 2 ml FACS-Puffer zugegeben, und mit Hilfe des Vortexers vermischt, mit anschließender Zentrifugation und Absaugung des Überstandes durch eine Wasserstrahlpumpe. Danach erfolgte ein zweiter entsprechender Waschvorgang.

Im nächsten Schritt wurden folgende Antikörper zugegeben: 4,0 µl CD86 PE, 10,0 µl CD143 FITC, 4,0 µl CD14 PerCP, 0,5 µl CD16 APC und in 51,5 µl FACS-Puffer aufgenommen und ge-vortext.

Anschließend wurden die Proben im Dunkeln bei 4 °C für 30 Minuten mit den monoklonalen Antikörpern inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde 2 ml BD-Lysing-Solution zur Erythrozytenlyse zugegeben, die Proben mittels Vortexers vermischt und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit 2 ml FACS-Puffer, um nicht-gebundene Antikörper zu beseitigen. Das nach Zentrifugation und Absaugung entstandene Pellet wurde in 200 µl PFA 1 % aufgenommen, ge-vortext und bis zur Messung, welche innerhalb von vier Stunden erfolgte, mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2.2 Immunophänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen**

Die in dieser Studie untersuchte Lymphozytengesamtpopulation wurde mittels sechs monoklonalen Antikörpern immunophänotypisiert.

Innerhalb der Lymphozyten wurden CD3-CD19<sup>+</sup> Zellen als B-Lymphozyten, CD3-CD16/56<sup>+</sup> Zellen als Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und CD3<sup>+</sup> Zellen als T-Lymphozyten definiert. Innerhalb der T-Lymphozyten erfolgte eine Unterteilung in CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, welche weiter in CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-Lymphozyten differenziert wurden.

Es wurden jeweils 100 µl Vollblut (aus der Lithium-Heparin Monovette) für die Färbung der Natürlichen Killerzellen / B-Zellen und der T-Helfer (TH)-Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert. Im nächsten Schritt wurden der NK- / B-Zellfärbung 6,0 µl CD3 FITC / CD16 PE/ CD 56 PE-Mix und 4,0 µl CD19 PerCP zugegeben und danach ge-vortext, analog dazu wurden der TH-Zellfärbung 4,0 µl CD8 PerCP, 2,0 µl CD28 FITC, 2,0 µl CD4 PE und 0,5 µl CD3 APC zugegeben und ebenfalls ge-vortext.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog dem oben aufgeführten Protokoll zur Monozytenfärbung.

### 3.2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die immunologischen Untersuchungen erfolgten mittels immunphänotypisierter Durchflusszytometrie. Die erfassten Daten wurden von einem einzelnen Untersucher ausgewertet. Für die Durchflusszytometrie wurde das FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) - Gerät Typ Calibur der Firma Becton Dickinson benutzt.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Einzelzellen in Suspension aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften analysiert werden. Diese Zellen werden in einer speziellen Trägerflüssigkeit so aufgetrennt und transportiert, dass die Zellen einzeln aufeinander folgend einen Laserstrahl passieren. Die Zellen werden mittels des Lasers seriell gemessen, während sie den Laserstrahl mit festgelegter Wellenlänge passieren. Wenn eine Zelle vom Laserstrahl getroffen wird, kommt es zur Lichtstreuung, ohne Beeinträchtigung der Wellenlänge. Es gibt zwei Arten von gestreutem Licht. Abhängig von der Zellgröße wird das Licht in Vorwärtsrichtung (FSC = Forward Scatter) und abhängig von der Granularität der Zelle wird das Licht in Seitwärtsrichtung (SSC = Sideward Scatter) im rechten Winkel zur Flussrichtung gestreut und gemessen.

Damit lassen sich die Zellen in einem so genannten Dot-Plot darstellen, wobei SSC gegen FSC aufgetragen wird. Jede einzelne Zelle, welche in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften charakterisiert ist, entspricht im Dot-Plot einem Punkt. So entstehen gruppiert strukturell ähnliche Zellen, die sich als zweidimensionale wolkige Kennfelder darstellen.

Die Zellen können zusätzlich mit Fluorochromfarbstoffen markiert werden, z.B. mit fluoreszierenden Antikörpern gegen antigene Epitope. Dieses Verfahren ist hochsensitiv und -spezifisch für die Darstellung von Leukozytensubpopulationen. Die an die Zelle gebundenen Fluorochromfarbstoffe werden vom Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht, diese Emissionen lassen Rückschlüsse auf die Expression der Oberflächenantigene auf jeder einzelnen Zelle zu.

Das FACS-Gerät Typ Calibur arbeitet mit einem dualen Lasersystem bestehend aus einem Argonlaser und einem Diodenlaser, welche Licht der Wellenlänge 488 nm bzw. 635 nm erzeugen. Der Argonlaser ist mit den zwei Streulichtdetektoren und drei zusätzlichen Fluoreszenzdetektoren (FL) verbunden. FL1 erkennt Licht der Wellenlänge 500-560 nm

(Grünbereich), FL2 543-627 nm (Orangebereich) und FL3  $\geq$  650 nm (Rotbereich). Dem Diodenlaser ist ein Fluoreszenzdetektor zugeordnet, FL4 erkennt Licht der Wellenlänge 645-676 nm (Rotbereich). Mittels des FACS-Geräts Typ Calibur können somit sechs verschiedene Eigenschaften (zwei Lichtstreuungen und vier Fluoreszenzen) einer einzelnen Zelle erfasst und miteinander verbunden werden.

Durch das Gating können selektiv Zellen erfasst werden, welche definierte Merkmale aufweisen, z.B. CD86-exprimierende Zellen als Monozyten. Somit können nachfolgend selektiv diejenigen Zellen mittels der Analyse von zwei Fluoreszenz-Detektoren untersucht werden, welche definierte Streulichteigenschaften oder weitere Fluoreszenzeigenschaften besitzen. Die jeweils analysierten Parameter werden auf einer logarithmischen Intensitätsskala aufgetragen und die durchschnittliche Signalintensität für einzelne Zellpopulationen berechnet. Die erfassten Daten der FACS-Messung wurden mit der CellQuest Pro Software von Becton Dickinson ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst die Monozyten über die Expression des panmonozytären Markers CD86 und die Lage im SSC, sowie über ihre Lage im FSC und SSC (Größe und Granularität) im Dot-Plot identifiziert. Die hierüber definierten Gesamtmonozyten wurden in einem eigenen Dot-Plot aufgetragen und darin die Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16 analysiert.

Wir differenzierten hierbei drei Monozytensubpopulationen:

CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten

CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten

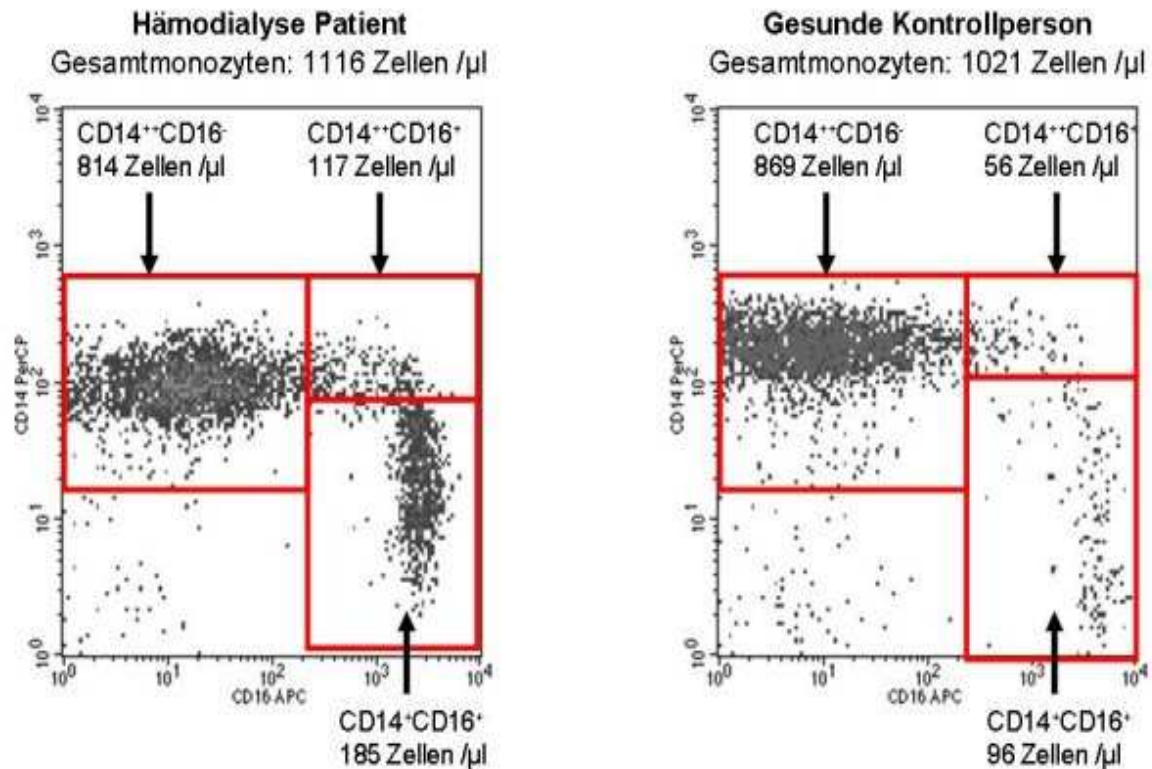


Abb. 1: Repräsentatives Beispiel von Verteilung der Monozytensubpopulationen bei einem Hämodialysepatienten und einem altersgleichen nierengesunden Probanden.

### 3.3 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Folgende Computerprogramme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Computerprogramme	Anwendung
Word, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland	Textverarbeitung
Excel, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland	Datenverarbeitung
Access, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland	Datenverwaltung
Power Point, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland	Tabellen und Abbildungen
SPSS 13.0, IBM, Ehningen, Deutschland	Statistik und Graphik
CellQuest Pro, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Tab. 2: Computerprogramme



Kategoriale Variablen wurden als prozentuale Anteile der jeweiligen Gesamtpopulation aufgeführt und mittels Fisher-Tests verglichen. Kontinuierliche Variablen wurde als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und mittels Mann-Whitney-Test (für zwei ungepaarte Variablen) oder Wilcoxon-Test (für die Vergleiche der Zellzahlen vor und während der Dialyse) verglichen.

Um den Einfluss des dialyse-induzierten Zellabfalls auf das ereignisfreie Überleben auszuwerten, definierten wir einen Abfall der Zellzahlen um mehr als 50 % der Ausgangswerte als „stark“ und einen Abfall der Zellzahlen um weniger als 50 % der Ausgangswerte als „gering“. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden berechnet und ereignisfreies Überleben wurde mittels Log-Rank-Test verglichen.

Cox-proportional-hazard-Modelle wurden berechnet, um das Verhältnis zwischen dem intradialytischen Abfall der Monozytenzahlen und dem ereignisfreien Überleben nach Adjustierung für solche Risikofaktoren, die in der univariaten Analyse Prädiktoren des kombinierten Endpunkts waren, zu überprüfen.

Um zu testen, inwieweit die prädialytischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytenzahlen und der intradialytische Abfall der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten voneinander unabhängige Prädiktoren des kombinierten Endpunktes darstellen, verglichen wir die Anzahl der Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen nach gleichzeitiger Stratifikation hinsichtlich der Zellzahlen der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten zu Studienbeginn (in Tertile), und hinsichtlich des intradialytischen Abfall der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (starker *versus* geringer Sturz).

Die Datenverarbeitung und die statistischen Berechnungen erfolgten durch SPSS 13.0. Das Signifikanzniveau wurde in allen Tests bei 5 % festgelegt.

---

## 4 ERGEBNISSE

---

Das Kollektiv der Hämodialysepatienten bestand aus 31 weiblichen und 39 männlichen Patienten im Alter zwischen 20 und 96 Jahren. Die weiteren Charakteristika sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Ursachen für eine chronische Nierenerkrankung Stadium 5 im vorliegenden Patientenkollektiv waren:

Diabetische Nephropathie (n = 26)

Glomerulonephritis (n = 13)

Nephrosklerose (n = 8)

Interstitielle Nephritis (n = 8)

Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (n = 5)

Andere primäre Nierenerkrankungen (n = 4)

Unbekannte Ursachen (n = 6)

Ein kardiovaskuläres Ereignis trat innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums bei 42 Patienten (60 %) auf. Sechs Patienten wurden aufgrund einer allogenen Nierentransplantation vor Eintritt eines kardiovaskulären Ereignisses zensiert. Die verbleibenden 22 Patienten wurden für  $42 \pm 2$  Monate nachverfolgt.

Die Patienten, welche ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten, waren älter und hatten eine höhere Prävalenz einer kardiovaskulären Erkrankung und eines Diabetes mellitus bei Studienbeginn. Ebenso zeigten die Patienten erhöhte Ausgangswerte von C-reaktivem Protein, erhöhte Gesamtmonozytenzahlen und erniedrigte Serumalbuminwerte (siehe folgende Tabelle).

	Insgesamt (n = 70)	Kein Ereignis (n = 28)	Ereignis (n = 42)	P-Wert
Alter (Jahre)	64,5 ± 15,6	55,5 ± 15,8	70,5 ± 12,3	<0,001
Frauen (n)	31 (44%)	15 (54%)	16 (38%)	0,228
Raucher (n)	13 (19%)	7 (25%)	6 (14%)	0,349
Diabetes mellitus (n)	35 (50%)	8 (29%)	27 (64%)	0,007
Prävalente kardiovaskuläre Erkrankung (n)	29 (41%)	5 (18%)	24 (57%)	<0,001
Zeit seit Initiierung einer Nierenersatztherapie (Jahre)	3,4 ± 3,9	3,4 ± 4,0	3,4 ± 3,9	0,947
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	97 ± 17	102 ± 17	94 ± 16	0,097
C-reaktives Protein (mg/l)	14,3 ± 18,0	10,0 ± 20,0	17,1 ± 16,3	0,013
Gesamtcholesterin (mg/dl)	166 ± 44	174 ± 44	161 ± 47	0,106
HDL Cholesterin (mg/dl)	49 ± 17	50 ± 15	48 ± 18	0,401
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 ± 4,8	26,8 ± 4,6	27,2 ± 5,0	0,737
Kalzium (mmol/l)	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,770
Phosphat (mg/dl)	6,1 ± 1,8	6,5 ± 2,0	5,8 ± 1,6	0,143
Albumin (g/l)	39 ± 4	40 ± 3	38 ± 4	0,042
Leukozyten/μl	7501 ± 2142	6979 ± 1541	7850 ± 2419	0,226
Monozyten/μl	639 ± 219	563 ± 203	689 ± 216	0,016
CD14++CD16- Monozyten/μl vor HD	463 ± 181	417 ± 185	494 ± 175	0,047
CD14++CD16+ Monozyten/μl vor HD	33 ± 19	27 ± 17	37 ± 19	0,011
CD14+CD16+ Monozyten/μl vor HD	143 ± 83	119 ± 49	158 ± 97	0,089

Tab. 3: Charakteristika der Studienpopulation

Gesamtleukozyten und Leukozytensubpopulationen wurden am Anfang und 10 Minuten nach Beginn der Hämodialysebehandlung gemessen. Vor Beginn der Hämodialysebehandlung hatten die Patienten mittlere Gesamtleukozytenzahlen von  $7501 \pm 2142 / \mu\text{l}$ . Innerhalb von 10 Minuten nach Beginn der Hämodialysebehandlung fielen die Leukozytenzahlen auf  $5703 \pm 2296 / \mu\text{l}$ , entsprechend einem Abfall der Zellzahlen um  $24,5 \pm 18,8 \%$ .

Der prägnanteste Abfall konnte bei den CD14++CD16+ Monozyten und den CD14+CD16+ Monozyten beobachtet werden (Abbildung 2).

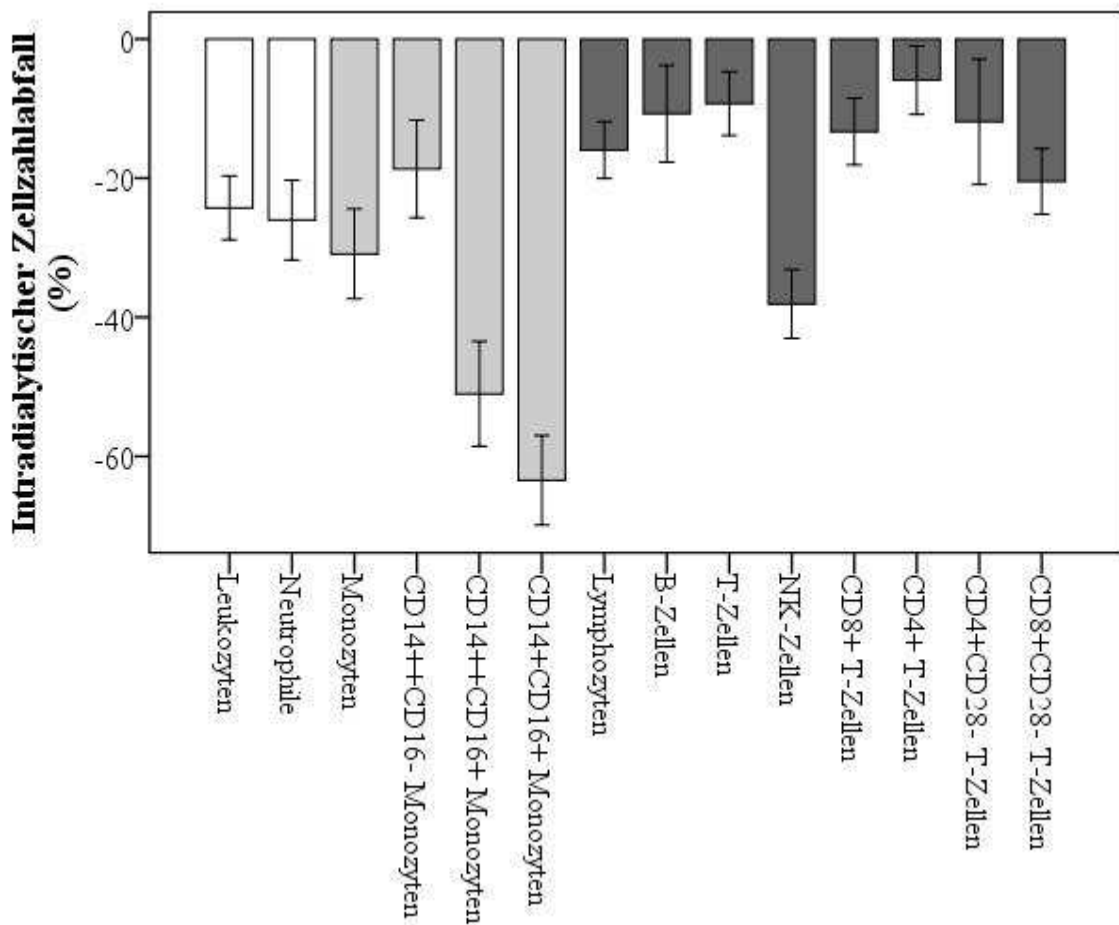


Abb. 2: Dialyse-induzierter Abfall der zirkulierenden Leukozyten nach Subpopulationen. Dargestellt sind Mittelwerte und 95 % Konfidenzintervalle. Für alle Leukozytensubpopulationen gilt, dass die intradialytischen Zellzahlen signifikant geringer waren als die prädialytischen Zellzahlen.

Innerhalb der Lymphozytensubpopulation zeigten nur Natürliche Killerzellen einen markanten intradialytischen Abfall, obwohl beim Vergleich von prädialytischen und intradialytischen Zellzahlen bei allen Leukozytensubpopulationen formal eine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Aufgrund des dominierenden Zellzahlabfalls der CD14++CD16+ Monozyten und der CD14+CD16+ Monozyten fokussiert die weitere Darstellung der Studienergebnisse auf eine detaillierte Analyse der Kinetik dieser Monozytensubpopulationen.

Patienten mit einem starken Abfall der CD14++CD16+ Monozyten (d.h. Zellzahlen zum Zeitpunkt 10 Minuten unterhalb 50 % der Ausgangswerte) zeigten keine Unterschiede in

ihren Ausgangscharakteristika im Vergleich zu Patienten mit einem geringen Abfall der CD14++CD16+ Monozyten (Tabelle 4). Dasselbe gilt nach Aufteilung der Patienten anhand des intradialytischen Abfalls von CD14+CD16+ Monozyten (Tabelle 5), da der intradialytische Sturz der CD14++CD16+ Monozyten und der CD14+CD16+ Monozyten eine starke Korrelation aufweisen ( $r = 0,918$ ,  $p < 0,001$ ). So hatten 41 Patienten einen starken Sturz der Zellzahlen beider Monozytensubpopulationen, 20 Patienten zeigten einen geringen Abfall der Zellzahlen beider Subpopulationen. Nur neun Patienten zeigten einen geringen Abfall der CD14++CD16+ Monozytenzahlen bei gleichzeitig starkem Abfall der CD14+CD16+ Monozytenzahlen.

	Starker Abfall (n = 41)	Geringer Abfall (n = 29)	P-Wert
Alter (Jahre)	62,6 ± 16,0	67,0 ± 14,9	0,478
Frauen (n)	19 (46%)	12 (41%)	0,808
Raucher (n)	8 (19%)	5 (17%)	1,000
Diabetes mellitus (n)	18 (44%)	17 (59%)	0,332
Prävalente kardiovaskuläre Erkrankung (n)	17 (42%)	12 (41%)	1,000
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	99 ± 18	94 ± 14	0,442
C-reaktives Protein (mg/l)	14,4 ± 19,1	14,0 ± 16,4	0,909
Gesamtcholesterin (mg/dl)	170 ± 47	161 ± 44	0,417
HDL Cholesterin (mg/dl)	45 ± 13	53 ± 20	0,128
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	27,3 ± 4,2	26,7 ± 5,6	0,387
Kalzium (mmol/l)	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	0,180
Phosphat (mg/dl)	5,8 ± 1,7	6,4 ± 1,9	0,217
Albumin (g/l)	38,3 ± 2,7	38,8 ± 4,6	0,541
Leukozyten/μl	7234 ± 1832	7879 ± 2503	0,414
Monozyten/μl	618 ± 205	670 ± 236	0,493
CD14++CD16- Monozyten/μl vor HD	452 ± 176	479 ± 191	0,681
CD14++CD16+ Monozyten/μl vor HD	31 ± 17	37 ± 21	0,176
CD14+CD16+ Monozyten/μl vor HD	135 ± 67	153 ± 102	0,844

Tab. 4: Charakteristika der Studienteilnehmer nach Stratifikation anhand des intradialytischen Abfalles der CD14++CD16+ Monozytenzellzahlen

	Starker Abfall (n = 50)	Geringer Abfall (n = 20)	P-Wert
Alter (Jahre)	63,1 ± 16,2	67,8 ± 13,7	0,370
Frauen (n)	24 (48%)	7 (35%)	0,427
Raucher (n)	11 (22%)	2 (10%)	0,322
Diabetes mellitus (n)	22 (44%)	13 (65%)	0,185
Prävalente kardiovaskuläre Erkrankung (n)	21 (42%)	8 (40%)	1,000
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	99 ± 18	92 ± 13	0,224
C-reaktives Protein (mg/l)	13,4 ± 18,0	16,4 ± 18,1	0,415
Gesamtcholesterin (mg/dl)	172 ± 46	152 ± 42	0,113
HDL Cholesterin (mg/dl)	47 ± 15	53 ± 20	0,202
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	27,0 ± 4,2	27,1 ± 6,2	0,785
Kalzium (mmol/l)	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	0,786
Phosphat (mg/dl)	5,8 ± 1,7	6,5 ± 2,0	0,180
Albumin (g/l)	38,6 ± 2,9	38,3 ± 5,0	0,990
Leukozyten/μl	7520 ± 2066	7455 ± 2379	0,696
Monozyten/μl	635 ± 204	650 ± 256	0,755
CD14++CD16- Monozyten/μl vor HD	460 ± 164	471 ± 223	0,745
CD14++CD16+ Monozyten/μl vor HD	32 ± 18	36 ± 22	0,716
CD14+CD16+ Monozyten/μl vor HD	142 ± 78	144 ± 98	0,559

Tab. 5: Charakteristika der Studienteilnehmer nach Stratifikation anhand des intradialytischen Abfalles der CD14+CD16+ Monozytenzellzahlen

In der univariaten Auswertung des Zusammenhangs zwischen dialyse-induziertem Zellsturz und ereignisfreiem Überleben zeigten Patienten mit einem starken Sturz der CD14++CD16+ Monozytenzahlen ein signifikant längeres ereignisfreies Überleben als Patienten mit einem geringen Abfall der Zellzahlen der CD14++CD16+ Monozyten (Abbildung 3).

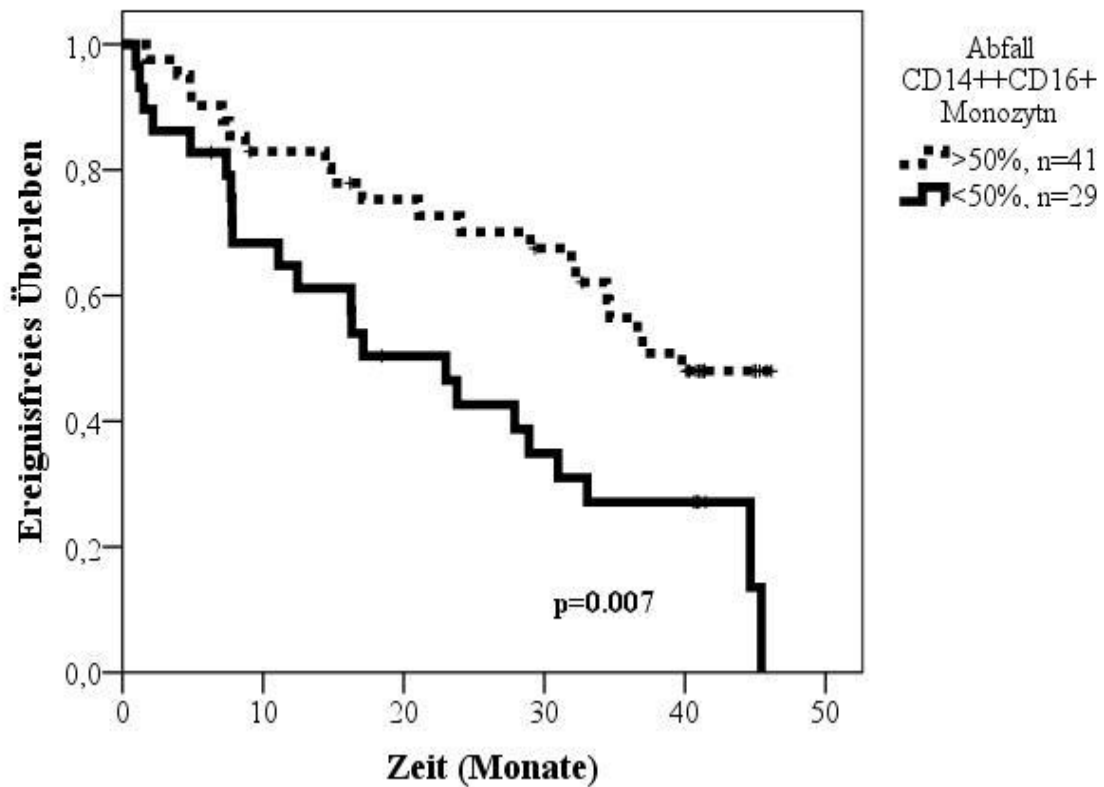


Abb. 3: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16+ Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).

Analog dazu zeigten Patienten mit einem starken intradialytischen Abfall der CD14+CD16+ Monozytenzahlen im Vergleich zu Patienten mit einem geringen Zellzahlabfall der CD14+CD16+ Monozyten ein tendenziell längeres ereignisfreies Überleben (Abbildung 4).

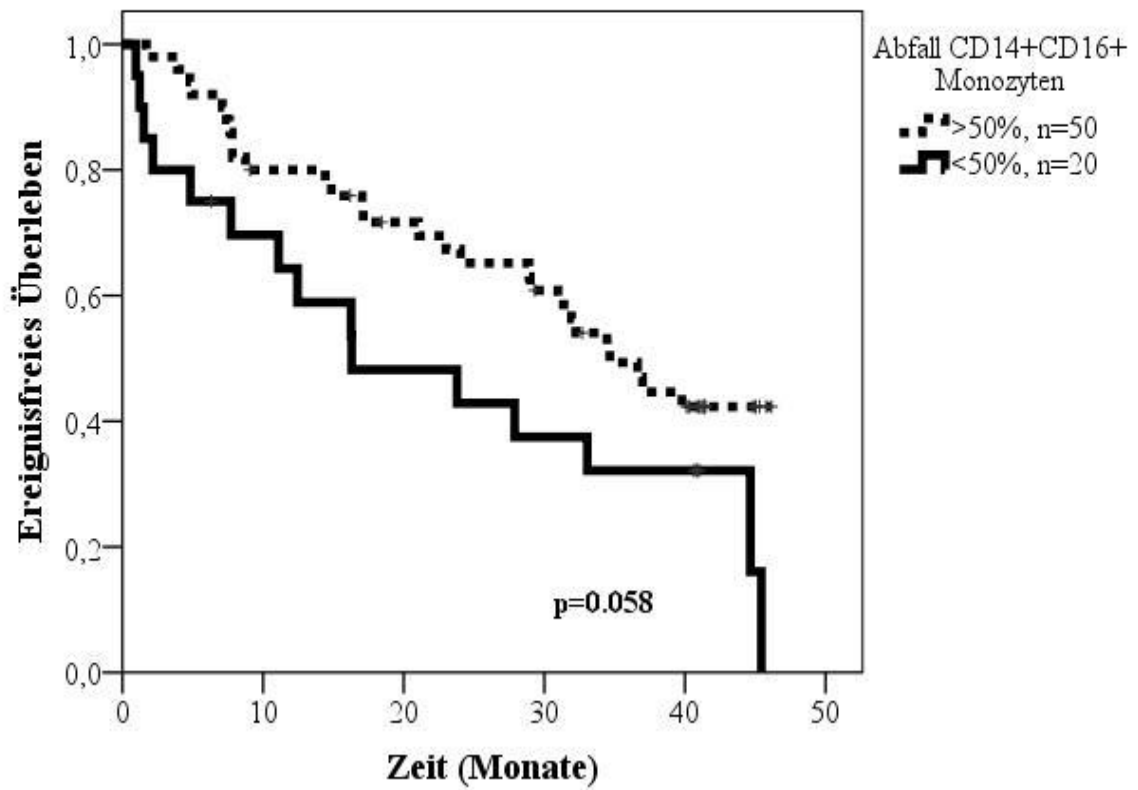


Abb. 4: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14+CD16+ Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).



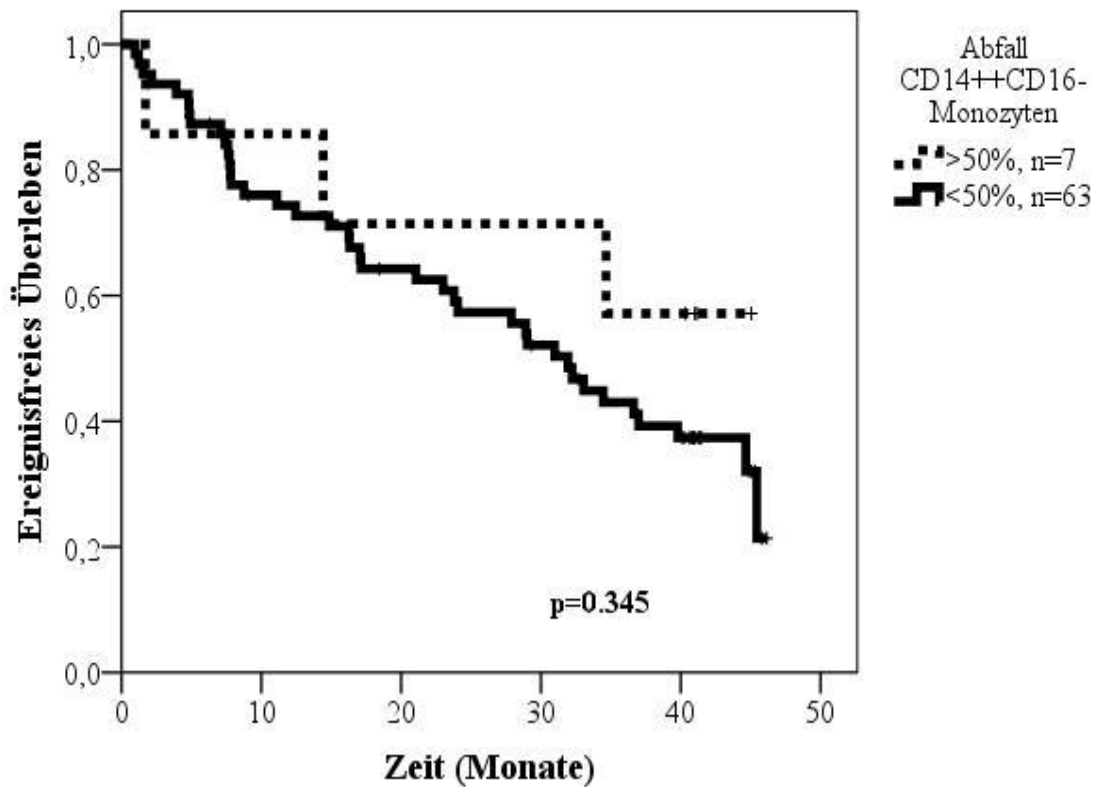


Abb. 5: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14+CD16- Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).

Ein geringer intradialytischer Abfall der CD14++CD16+ Monozyten (auf Werte größer als 50 % der Ausgangswerte nach 10 Minuten) blieb nach Korrektur für Risikofaktoren, welche in univariater Analyse Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse waren - Alter, prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, C-reaktives Protein und Albumin - ein signifikanter Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Hazard ratio 2,191 [95 % Konfidenzintervall 1,134-4,234]; Abbildung 6).

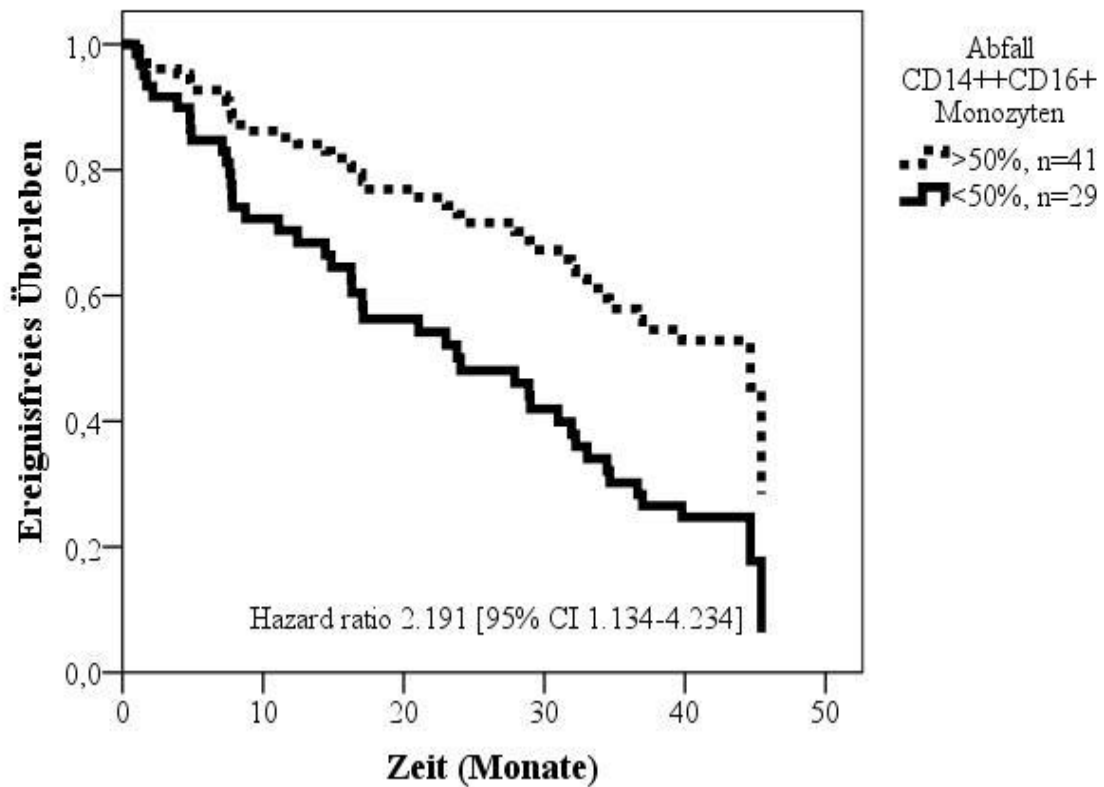


Abb. 6: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16+ Monozytenzahlen (Cox-Regression-Überlebensdarstellung).

	Hazard ratio	95 % Konfidenzintervall
Alter (Jahre)	1,021	0,992-1,051
Diabetes mellitus (ja)	1,308	0,609-2,806
Positive kardiovaskuläre Anamnese (ja)	1,749	0,796-3,844
Albumin (g/l)	0,923	0,834-1,020
C-reaktives Protein (mg/l)	1,010	0,994-1,026
CD14++CD16+ Monozytensturz größer 50 % der Ausgangswerte	2,191	1,134-4,234

Tab. 6: Prädiktoren des ereignisfreien Überlebens (Cox-Regressionsanalyse)

Bei gleichzeitiger Betrachtung der prädialytischen CD14++CD16+ Monozytenzellzahlen und des intradialytischen Abfalls der CD14++CD16+ Monozyten wiesen diejenigen Patienten die höchste kardiovaskuläre Ereignisrate auf, welche die höchsten prädialytischen CD14++CD16+ Monozytenzellzahlen und einen geringen intradialytischen Abfall der CD14++CD16+ Monozyten zeigten (Abbildung 7).

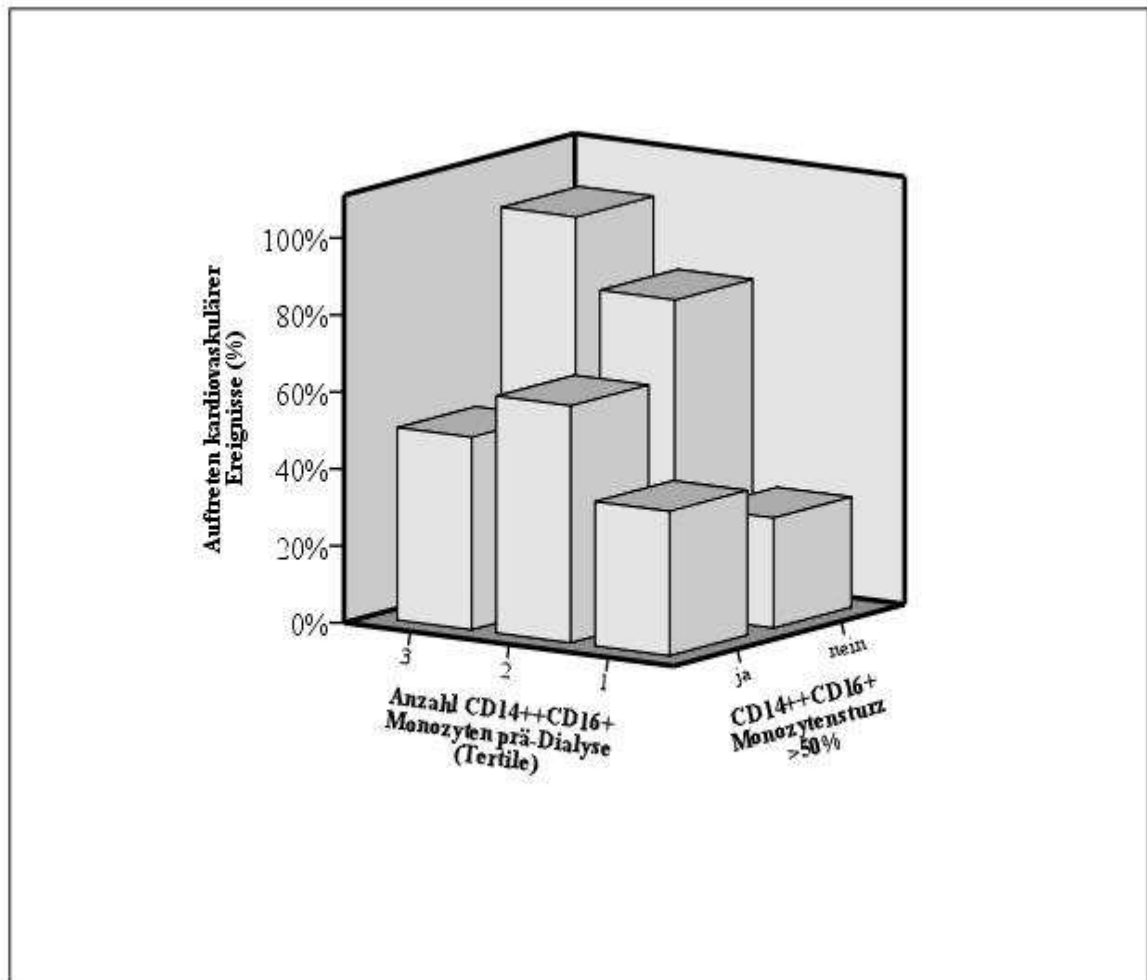


Abb. 7: Prozentuale Darstellung der Patienten, welche während der Nachbeobachtungsphase ein kardiovaskuläres Ereignis erleiden, in Abhängigkeit von der Anzahl prädialytischer CD14++CD16+ Monozyten (in Tertilen) und von der Höhe des intradialytischen Abfalls der CD14++CD16+ Monozyten (starker *versus* geringer Sturz).

Es zeigte sich kein Unterschied in der Zeit bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung zwischen Patienten mit einem starken oder geringen Abfall der CD14++CD16- Monozyten ( $p = 0,735$ ), der CD14++CD16+ Monozyten ( $p = 0,054$ ) und der CD14+CD16+ Monozyten ( $p = 0,346$ ; Log Rank Test) (Abbildungen 8-10).

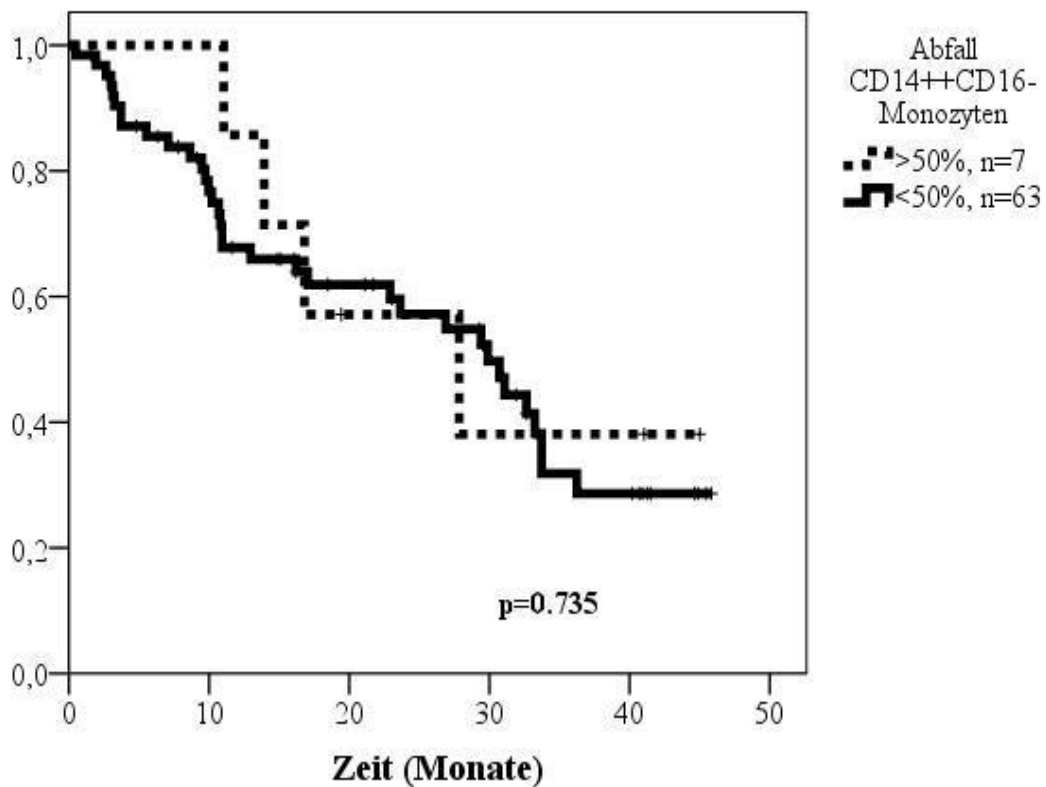


Abb. 8: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16- Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).

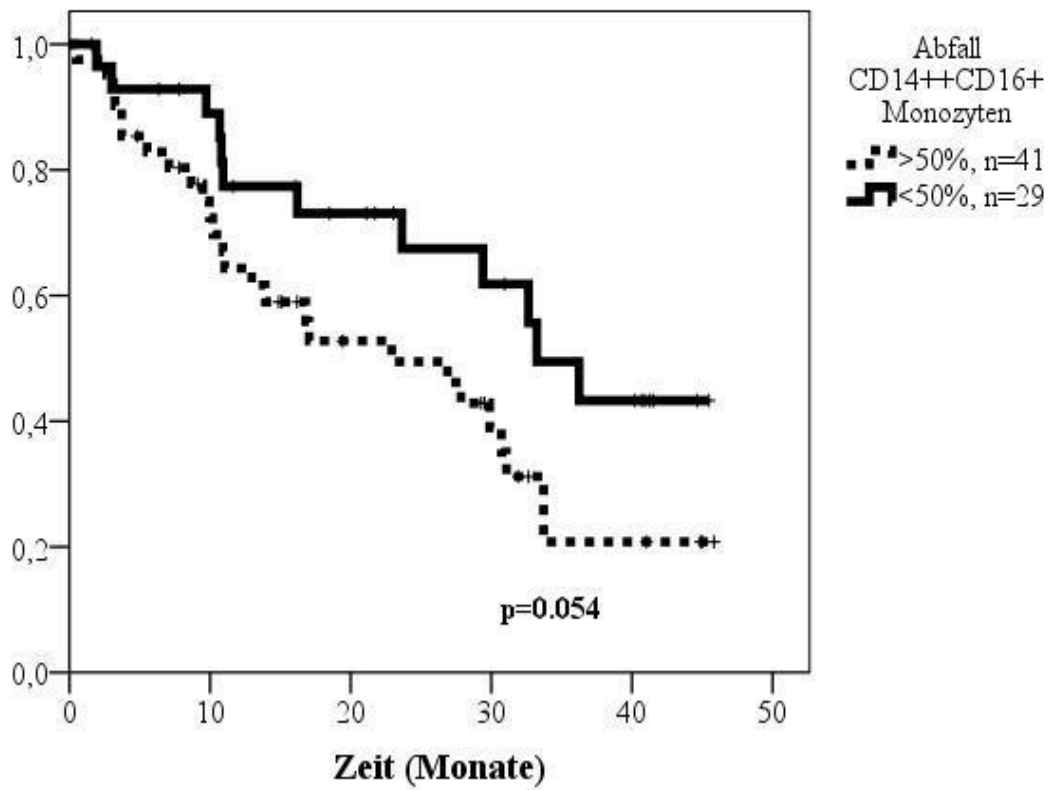


Abb. 9: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16+ Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).

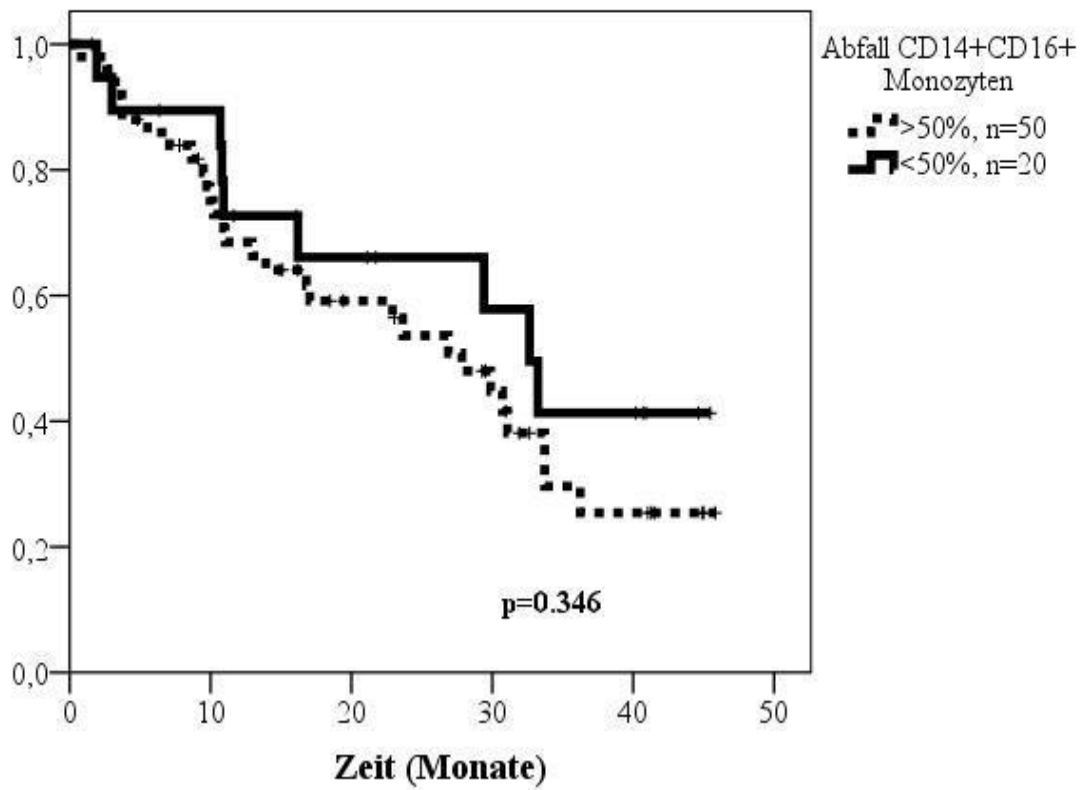


Abb. 10: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14+CD16+ Monozyten (Kaplan-Meier-Analyse mit Log-Rank-Test).

## 5 DISKUSSION

---

Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung im Stadium 5 haben eine massiv verkürzte Lebenserwartung, vergleichbar mit Patienten, die an bestimmten malignen Tumorerkrankungen leiden (Pastan et al., 1998). Epidemiologische Daten belegen, dass infolge einer beschleunigten Atherogenese kardiovaskuläre Ereignisse die prägnanteste Ursache der Mortalität bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sind (Go et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Dialysepatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ein zehn- bis zwanzigfach erhöhtes Risiko aufweisen an einer Herz-Kreislaufkrankung zu versterben (Foley et al., 1998; de Jager et al., 2009). Die zugrundeliegenden Ursachen für diese erhöhte atherosklerotische Bürde sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren können die beschleunigte Atherogenese zumindest nicht allein erklären. In epidemiologischen Studien zeigt sich keine konsistente Assoziation zwischen Hypercholesterinämie und arterieller Hypertonie (Sarnak et al., 2002). In Einklang dazu erbrachte in randomisierten Studien weder die Senkung der Hypercholesterinämie mittels Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern (Wanner et al., 2005; Fellström et al., 2009), noch die Einnahme des in der Allgemeinbevölkerung kardio- und vaskuloprotektiven ACE-Hemmers (Zannad et al., 2006) einen prognostischen Benefit.

Daher erscheinen alternative Risikofaktoren für die beschleunigte Atherosklerose nierenkranker Menschen verantwortlich (Ronco et al., 2008), unter den zahlreichen pathologischen Veränderungen bei chronisch nierenkranken Patienten erscheint - neben Störungen im Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel mit Hypovitaminose D, Hyperparathyreoidismus und Hyper-Fibroblast-Growth-Faktor-23-Ämie (Seiler et al., 2009), Hypervolämie (Agarwal et al., 2009), Sympathikusaktivierung (Blankestijn, 2004) sowie erhöhtem oxidativen Stress (Himmelfarb et al., 2002) - die persistierende Mikroinflammation als etablierter Mechanismus (Stenvinkel et al., 2005; Kato et al., 2008).

Im Zentrum dieser Mikroinflammation steht eine Monozytenaktivierung (Girndt et al., 2003) mit Veränderung der Zusammensetzung der Monozytensubpopulationen durch

Zunahme der Anzahl der CD16+ Monozyten (Nockher et al., 1998).

Diese CD16+ Monozyten werden als proinflammatorische Zellen angesehen. So vermögen CD16+ Monozyten im Vergleich zur Subpopulation der CD14++CD16- Monozyten verstärkt das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  zu bilden (Belge et al., 2002). Zusätzlich exprimieren CD16+ Monozyten auf ihrer Oberfläche höhere Spiegel des Fractalkin-Rezeptors CX3CR1 (Ancuta et al., 2003), welcher als zentraler Chemokinrezeptor in der Atherogenese betrachtet wird (Damas et al., 2005). Des Weiteren zeigen CD16+ Monozyten im Vergleich zu den CD14++CD16- Monozyten eine stärkere Expressierung von bestimmten Adhäsionsmolekülen (Steppich et al., 2000).

Auf der Basis dieser *in vitro* Ergebnisse wurde eine zentrale Bedeutung der CD16+ Monozyten in der Atherogenese postuliert (Ziegler-Heitbrock et al., 2007; Auffray et al., 2007). Unsere Arbeitsgruppe berichtete, dass CD14++CD16+ Monozytenzahlen auch nach Korrektur für etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Hämodialysepatienten waren (Heine et al., 2008; Ulrich et al., 2010). Ebenso erwiesen sich die CD14++CD16+ Monozyten bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung vor Einsetzen der Dialysepflichtigkeit als unabhängige Prognosemarker (Rogacev et al., 2011).

Ein temporärer Leukozytenzellabfall während einer Hämodialysebehandlung ist bereits seit der Verwendung bioinkompatibler Dialysemembranen bekannt, es kommt zur transienten Leukozytenadhäsion an Endothelzellen des pulmonalen Kreislaufes (Girndt et al., 1999). In Übereinstimmung mit ihrer hohen endothelialen Affinität (Steppich et al., 2000), bleiben die CD16+ Monozyten die einzige Leukozytensubpopulation, welche einen relevanten vorübergehenden transienten Abfall der Zellzahlen während der Hämodialyse mit biokompatiblen Membranen zeigt (Sester et al., 2001; Nockher et al., 2001).

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits im Vorfeld darstellen, dass die CD16+ Monozytenzellzahlen am Ende einer Hämodialysebehandlung wieder ungefähr auf ihre Ausgangswerte vor der Dialysetherapie ansteigen. Nachdem die CD16+ Monozyten am Ende einer Dialysebehandlung keine Marker unreifer Monozyten, wie z.B. CD34 aufweisen, kann angenommen werden, dass nicht die Apoptose mit kompensatorisch vermehrter Auswanderung unreifer Monozyten aus dem Knochenmark, sondern eine



vorübergehende Sequestration die wahrscheinlichste Ursache für den Abfall dieser Zellreihe ist (Sester et al., 2001).

In Analogie zu älteren Beobachtungen zur Leukozytopenie bei Einsatz bioinkompatibler Membranen, welche eine Sequenzierung der Leukozyten an Endothelzellen des Lungenkreislaufes nachwies (Girndt et al., 1999), adhärirt vermutlich die Mehrheit der CD16+ Monozyten während der Hämodialyse an das pulmonale Gefäßsystem. Allerdings muss vermutet werden, dass einige der durch die Hämodialyse aktivierten CD16+ Monozyten aufgrund ihres Expressionsmusters von proatherosklerotischen Chemokinrezeptoren an geschädigtes bzw. verändertes Endothel im Bereich atherosklerotischer Läsionen adhärirten. Nachfolgend könnten diese CD16+ Monozyten in die Läsionen migrieren und dort zu einer weiteren lokalen Eskalation der Inflammation beitragen. Demnach könnte möglicherweise jeder einzelne dialyse-induzierte Abfall der CD16+ Monozyten zur Progredienz von atherosklerotischen Läsionen beitragen.

Falls diese Hypothese zutrifft, müssten Patienten mit einem starken intradialytischen Abfall der CD16+ Monozyten ein erhöhtes Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse zeigen.

Überraschenderweise konnte dies nicht bestätigt werden. Es stellte sich im Gegenteil heraus, dass nicht ein starker, sondern ein geringer Abfall der CD16+ Monozytenzahlen während der Hämodialysebehandlung mit einer schlechteren kardiovaskulären Prognose assoziiert war. Nach Korrektur für alle diejenigen Variablen, welche in der univariaten Analyse Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse waren, wurde ein geringer dialyse-induzierter Abfall der CD16+ Monozyten (d.h. Abfall der Werte um weniger als 50 % der Ausgangswerte) in unserer Studie als stärkster unabhängiger Prädiktor für das Eintreten eines kardiovaskulären Ereignisses identifiziert.

Bei zusätzlicher Berücksichtigung der absoluten prädialytischen CD16+ Monozytenzellzahlen wiesen diejenigen Patienten das höchste kardiovaskuläre Risiko auf, welche die meisten prädialytischen CD14++CD16+ Monozyten und einen geringen intradialytischen Zellzahlabfall dieser CD14++CD16+ Monozyten bei Studienbeginn hatten.

Wir können nur spekulieren, welche Mechanismen unseren Ergebnissen zugrunde liegen können. Möglicherweise reflektiert ein geringer dialyse-induzierter CD16+ Monozytensturz eine inadäquate Adhäsionsreaktion der CD16+ Monozyten auf adäquate immunologische Stimuli, wie sie der Kontakt mit einer Dialysemembran und dem Schlauchsystem während der Hämodialyse darstellen. Eine solche verminderte Adhäsionsreaktion könnte eine ausgeprägtere Dysfunktion der CD16+ Monozyten von Hochrisikopatienten widerspiegeln. Interessanterweise handelt es sich bei der Einwanderung von Monozyten in atherosklerotische Gefäßläsionen nicht um einen unidirektionalen Prozess. Vielmehr wird neben der Migration vom Lumen in die Intima parallel eine (prinzipiell erwünschte) Emigration von Monozyten in das Lumen beobachtet (Llodra et al., 2004). Daher könnte eine verminderte Monozytenmobilität während der Dialyse auch mit einer veränderten Mobilität in anderen pathophysiologischen Prozessen, wie der Monozytenemigration aus atherosklerotischen Plaques einhergehen. Allerdings fehlen bisher experimentelle Daten, die eine solche hypothetische Assoziation bestätigen könnten.

Limitationen:

Es ist anzumerken, dass die Untersuchung des Verhältnisses zwischen Zellzahlkinetik und Infektionen nicht unser Primärziel war, daher sollte die Verbindung zwischen der intradialytischen Monozytopenie und infektiösen Komplikationen in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, welche in erster Linie infektiöse Erkrankungen beurteilen unter Berücksichtigung gezielter Pathogene.

Aufgrund des Studiendesigns als Kohortenstudie, können lediglich Assoziationen und keine Kausalitäten bezüglich der dialyse-induzierten CD16+ Monozytopenie und kardiovaskulären Ereignissen berichtet werden. Ebenso können wir keine mechanistischen Angaben über dialyse-induzierte CD16+ Monozytopenie und kardiovaskuläre Ereignisse treffen, deshalb müssen unsere Ergebnisse in weiteren Studien bekräftigt werden.

Weiterhin umfasst die Studienpopulation eine nur kleine Probandenanzahl, dies ist allerdings dem aufwändigen Studiendesign geschuldet. Aufgrund der geringen Probandenanzahl sollte die Beziehung zwischen dialyse-induzierter Monozytopenie und kardiovaskulären Folgen in größeren Kohortenstudien überprüft werden.

Zusammenfassend verwirft die dargestellte Dissertationsschrift die Hypothese, dass ein ausgeprägter intradialytischer Zellzahlabfall Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse ist. Die erhöhte Ereignisrate bei Patienten mit einer hohen prädialytischen Anzahl zirkulierender CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten bestätigt erneut eine potentiell zentrale Rolle dieser Zellpopulation in der Atherogenese nierenkranker Menschen, die weiterer wissenschaftlicher Beachtung verdient.

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Agarwal,R., Alborzi,P., Satyan,S., and Light,R.P. (2009). Dry-weight reduction in hypertensive hemodialysis patients (DRIP): a randomized, controlled trial. *Hypertension* 53, 500-507.
2. Ancuta,P., Rao,R., Moses,A., Mehle,A., Shaw,S.K., Luscinskas,F.W., and Gabuzda,D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* 197, 1701-1707.
3. Arikan,H., Koc,M., Tuglular,S., Ozener,C., and Akoglu,E. (2009). Elevated plasma levels of PAI-1 predict cardiovascular events and cardiovascular mortality in prevalent peritoneal dialysis patients. *Ren Fail.* 31, 438-445.
4. Asanuma,Y., Oeser,A., Shintani,A.K., Turner,E., Olsen,N., Fazio,S., Linton,M.F., Raggi,P., and Stein,C.M. (2003). Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 349, 2407-2415.
5. Auffray,C., Fogg,D., Garfa,M., Elain,G., Join-Lambert,O., Kayal,S., Sarnacki,S., Cumano,A., Lauvau,G., and Geissmann,F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.
6. Baeten,D., Boots,A.M., Steenbakkers,P.G., Elewaut,D., Bos,E., Verheijden,G.F., Berheijden,G., Miltenburg,A.M., Rijnders,A.W., Veys,E.M., and De,K.F. (2000). Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1233-1243.
7. Barreto,D.V., Barreto,F.C., Liabeuf,S., Temmar,M., Lemke,H.D., Tribouilloy,C., Choukroun,G., Vanholder,R., and Massy,Z.A. (2010). Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 77, 550-556.
8. Belge,K.U., Dayyani,F., Horelt,A., Siedlar,M., Frankenberger,M., Frankenberger,B., Espevik,T., and Ziegler-Heitbrock,L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168, 3536-3542.
9. Blankestijn,P.J. (2004). Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 1354-1357.
10. Bologa,R.M., Levine,D.M., Parker,T.S., Cheigh,J.S., Serur,D., Stenzel,K.H., and Rubin,A.L. (1998). Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 32, 107-114.
11. Craddock,P.R., Fehr,J., Dalmaso,A.P., Brigham,K.L., and Jacob,H.S. (1977).

- Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J. Clin. Invest* 59, 879-888.
12. Damas,J.K., Boullier,A., Waehre,T., Smith,C., Sandberg,W.J., Green,S., Aukrust,P., and Quehenberger,O. (2005). Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2567-2572.
  13. de Jager,D.J., Grootendorst,D.C., Jager,K.J., van Dijk,P.C., Tomas,L.M., Ansell,D., Collart,F., Finne,P., Heaf,J.G., De,M.J., Wetzels,J.F., Rosendaal,F.R., and Dekker,F.W. (2009). Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *JAMA* 302, 1782-1789.
  14. Fellstrom,B.C., Jardine,A.G., Schmieder,R.E., Holdaas,H., Bannister,K., Beutler,J., Chae,D.W., Chevaile,A., Cobbe,S.M., Gronhagen-Riska,C., De Lima,J.J., Lins,R., Mayer,G., McMahan,A.W., Parving,H.H., Remuzzi,G., Samuelsson,O., Sonkodi,S., Sci,D., Suleymanlar,G., Tsakiris,D., Tesar,V., Todorov,V., Wiecek,A., Wuthrich,R.P., Gottlow,M., Johnsson,E., and Zannad,F. (2009). Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 360, 1395-1407.
  15. Fingerle,G., Pforte,A., Passlick,B., Blumenstein,M., Strobel,M., and Ziegler-Heitbrock,H.W. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170-3176.
  16. Fischer,L.M., Schlienger,R.G., Matter,C., Jick,H., and Meier,C.R. (2004). Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 93, 198-200.
  17. Foley,R.N., Parfrey,P.S., and Sarnak,M.J. (1998). Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, S16-S23.
  18. Frankenberger,M., Sternsdorf,T., Pechumer,H., Pforte,A., and Ziegler-Heitbrock,H.W. (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87, 373-377.
  19. Girndt,M., Kohler,H., Schiedhelm-Weick,E., Schlaak,J.F., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Fleischer,B. (1995). Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 47, 559-565.
  20. Girndt,M., Sester,U., Kaul,H., and Kohler,H. (1998). Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1689-1696.
  21. Girndt,M., Heisel,O., and Kohler,H. (1999). Influence of dialysis with polyamide vs haemophan haemodialysers on monokines and complement activation during a 4-

- month long-term study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14, 676-682.
22. Girndt,M., Ulrich,C., Kaul,H., Sester,U., Sester,M., and Kohler,H. (2003). Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis. *Kidney Int. Suppl* S76-S79.
  23. Go,A.S., Chertow,G.M., Fan,D., McCulloch,C.E., and Hsu,C.Y. (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* 351, 1296-1305.
  24. Hak,A.E., Karlson,E.W., Feskanich,D., Stampfer,M.J., and Costenbader,K.H. (2009). Systemic lupus erythematosus and the risk of cardiovascular disease: results from the nurses' health study. *Arthritis Rheum.* 61, 1396-1402.
  25. Heine,G.H., Ulrich,C., Seibert,E., Seiler,S., Marell,J., Reichart,B., Krause,M., Schlitt,A., Kohler,H., and Girndt,M. (2008). CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int.* 73, 622-629.
  26. Hemingway,H., Philipson,P., Chen,R., Fitzpatrick,N.K., Damant,J., Shipley,M., Abrams,K.R., Moreno,S., McAllister,K.S., Palmer,S., Kaski,J.C., Timmis,A.D., and Hingorani,A.D. (2010). Evaluating the quality of research into a single prognostic biomarker: a systematic review and meta-analysis of 83 studies of C-Reactive protein in stable coronary artery disease. *PLoS. Med.* 7, e1000286.
  27. Himmelfarb,J., Stenvinkel,P., Ikizler,T.A., and Hakim,R.M. (2002). The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 62, 1524-1538.
  28. Hume,D.A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 49-53.
  29. Kaplow,L.S. and Goffinet,J.A. (1968). Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA* 203, 1135-1137.
  30. Kato,S., Chmielewski,M., Honda,H., Pecoits-Filho,R., Matsuo,S., Yuzawa,Y., Tranaeus,A., Stenvinkel,P., and Lindholm,B. (2008). Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1526-1533.
  31. Kaysen,G.A., Dubin,J.A., Muller,H.G., Mitch,W.E., Rosales,L., and Levin,N.W. (2003). Impact of albumin synthesis rate and the acute phase response in the dual regulation of fibrinogen levels in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 63, 315-322.
  32. Kim,H.W., Yang,H.N., Kim,M.G., Choi,H.M., Jo,S.K., Cho,W.Y., and Kim,H.K. (2011). Microinflammation in Hemodialysis Patients Is Associated with Increased CD14CD16(+) Pro-Inflammatory Monocytes: Possible Modification by On-Line Hemodiafiltration. *Blood Purif.* 31, 281-288.
  33. Kudo,S., Mizuno,K., Hirai,Y., and Shimizu,T. (1990). Clearance and tissue

- distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. *Cancer Res.* 50, 5751-5755.
34. Llodra,J., Angeli,V., Liu,J., Trogan,E., Fisher,E.A., and Randolph,G.J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11779-11784.
  35. Lo,J., Abbara,S., Shturman,L., Soni,A., Wei,J., Rocha-Filho,J.A., Nasir,K., and Grinspoon,S.K. (2010). Increased prevalence of subclinical coronary atherosclerosis detected by coronary computed tomography angiography in HIV-infected men. *AIDS* 24, 243-253.
  36. Lowrie,E.G. and Lew,N.L. (1990). Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am. J. Kidney Dis.* 15, 458-482.
  37. Meuer,S.C., Hauer,M., Kurz,P., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Kohler,H. (1987). Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses. *J. Clin. Invest* 80, 743-749.
  38. Nockher,W.A. and Scherberich,J.E. (1998). Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* 66, 2782-2790.
  39. Nockher,W.A., Wiemer,J., and Scherberich,J.E. (2001). Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 49-55.
  40. Panichi,V., Rizza,G.M., Paoletti,S., Bigazzi,R., Aloisi,M., Barsotti,G., Rindi,P., Donati,G., Antonelli,A., Panicucci,E., Tripepi,G., Tetta,C., and Palla,R. (2008). Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 2337-2343.
  41. Passlick,B., Flieger,D., and Ziegler-Heitbrock,H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.
  42. Pastan,S. and Bailey,J. (1998). Dialysis therapy. *N. Engl. J. Med.* 338, 1428-1437.
  43. Ridker,P.M., Cushman,M., Stampfer,M.J., Tracy,R.P., and Hennekens,C.H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* 336, 973-979.
  44. Rogacev,K.S., Seiler,S., Zawada,A.M., Reichart,B., Herath,E., Roth,D., Ulrich,C., Fliser,D., and Heine,G.H. (2011). CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular

- outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur. Heart J.* 32, 84-92.
45. Ronco,C., Haapio,M., House,A.A., Anavekar,N., and Bellomo,R. (2008). Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1527-1539.
  46. Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.
  47. Saionji,K. and Ohsaka,A. (2001). Expansion of CD4+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol.* 105, 21-26.
  48. Sarnak,M.J., Coronado,B.E., Greene,T., Wang,S.R., Kusek,J.W., Beck,G.J., and Levey,A.S. (2002). Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin. Nephrol.* 57, 327-335.
  49. Schindler,R., Beck,W., Deppisch,R., Aussieker,M., Wilde,A., Gohl,H., and Frei,U. (2004). Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 3207-3214.
  50. Schlitt,A., Heine,G.H., Blankenberg,S., Espinola-Klein,C., Dopheide,J.F., Bickel,C., Lackner,K.J., Iz,M., Meyer,J., Darius,H., and Rupprecht,H.J. (2004). CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb. Haemost.* 92, 419-424.
  51. Seiler,S., Heine,G.H., and Fliser,D. (2009). Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl* S34-S42.
  52. Sester,U., Sester,M., Heine,G., Kaul,H., Girndt,M., and Kohler,H. (2001). Strong depletion of CD14(+)/CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16, 1402-1408.
  53. Skrzeczynska,J., Kobylarz,K., Hartwich,Z., Zembala,M., and Pryjma,J. (2002). CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand. J. Immunol.* 55, 629-638.
  54. Stenvinkel,P., Heimbürger,O., Wang,T., Lindholm,B., Bergström,J., and Elinder,C.G. (1999). High serum hyaluronan indicates poor survival in renal replacement therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 34, 1083-1088.
  55. Stenvinkel,P., Pecoits-Filho,R., and Lindholm,B. (2003). Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1927-1939.
  56. Stenvinkel,P., Ketteler,M., Johnson,R.J., Lindholm,B., Pecoits-Filho,R., Riella,M., Heimbürger,O., Cederholm,T., and Girndt,M. (2005). IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 67, 1216-1233.



57. Steppich,B., Dayyani,F., Gruber,R., Lorenz,R., Mack,M., and Ziegler-Heitbrock,H.W. (2000). Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C578-C586.
58. Thieblemont,N., Weiss,L., Sadeghi,H.M., Estcourt,C., and Haeffner-Cavaillon,N. (1995). CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol.* 25, 3418-3424.
59. Toren,M., Goffinet,J.A., and Kaplow,L.S. (1970). Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis. *Blood* 36, 337-340.
60. Tripepi,G., Mallamaci,F., and Zoccali,C. (2005). Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 *Suppl 1*, S83-S88.
61. Ulrich,C., Heine,G.H., Seibert,E., Fliser,D., and Girndt,M. (2010). Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 2265-2272.
62. Wanner,C., Krane,V., Marz,W., Olschewski,M., Mann,J.F., Ruf,G., and Ritz,E. (2005). Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 353, 238-248.
63. Zannad,F., Kessler,M., Lehert,P., Grunfeld,J.P., Thuilliez,C., Leizorovicz,A., and Lechat,P. (2006). Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int.* 70, 1318-1324.
64. Ziegler-Heitbrock,H.W., Fingerle,G., Strobel,M., Schraut,W., Stelter,F., Schutt,C., Passlick,B., and Pforte,A. (1993). The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23, 2053-2058.
65. Ziegler-Heitbrock,H.W. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunol. Today* 17, 424-428.
66. Ziegler-Heitbrock,L. (2007). The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81, 584-592.
67. Ziegler-Heitbrock,L., Ancuta,P., Crowe,S., Dalod,M., Grau,V., Hart,D.N., Leenen,P.J., Liu,Y.J., Macpherson,G., Randolph,G.J., Scherberich,J., Schmitz,J., Shortman,K., Sozzani,S., Strobl,H., Zembala,M., Austyn,J.M., and Lutz,M.B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*.
68. Zimmermann,J., Herrlinger,S., Pruy,A., Metzger,T., and Wanner,C. (1999). Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 55, 648-658.

## 7 DANKSAGUNG

---

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Matthias Girndt für die Bereitstellung des Themas, ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Danilo Fliser und Herrn Professor Dr. med. Hans Köhler für die Möglichkeit diese Dissertation in der Klinik für Innere Medizin IV erstellen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Gunnar Heine für die wissenschaftliche und klinische Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit. Seine unerschöpfliche Geduld und die großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung trugen in hohem Maße zum Gelingen diese Arbeit bei.

Gleichfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Christof Ulrich für die umfassende wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertation, er stand mir bei allen anfallenden labortechnischen Problemen mit exzellenten Ratschlägen zur Seite.

Bedanken möchte ich mich bei allen Patienten und Mitarbeitern der Dialysestationen, des immunologischen Labors der Inneren Medizin IV und bei Elena, Kathrin, Lutz, Mario und Tobias für die schöne gemeinsame Laborzeit.

Ein besonderer Dank gilt all den lieben Menschen, welche mich in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit unendlich motiviert, unterstützt und an die Fertigstellung geglaubt haben.

Meiner Mama danke ich für ihren Rückhalt in jeglichen Lebenslagen und das Ermöglichen meines Studiums.

## 8 PUBLIKATION

---

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Zeitschrift „Nephrology Dialysis Transplantation“ veröffentlicht:

Rogacev,K.S., Ziegelin,M., Ulrich,C., Seiler,S., Girndt,M., Fliser,D., und Heine,G.H. (2009). Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 3480-3486.

## 9 ANHANG

### 9.1 Materialien

#### 9.1.1 Geräte

Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Eisflockenmaschine (Scotsman)	Tepa, Barsbüttel, Deutschland
Eppendorffzentrifuge Minifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage Ohaus	Ohaus Europe, Nänikon, Schweiz
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Gilson Kolbenhubpipetten	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen, Deutschland
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz, Deutschland
Pipetboy plus	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
MagneticCellSeparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minishaker IKA	IKA-Works, Wilmington, USA
Spannungsquelle Consort E452	UniEquip, Martinsried, Deutschland
Sterile Werkbank Laminair HB2472	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Vortex Mixer K	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tab. 7: Geräte

### 9.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml-Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, Deutschland
15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Einmal-Plastikpipetten	Cornig Costar, Wiesbaden, Deutschland
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Filterpipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Seath Fluid	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Parafilm 'M'	American National Can, Chicago, USA
Perfusionsbesteck „Tro-Venose“	Troge Medical, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 8: Verbrauchsmaterialien

### 9.1.3 Substanzen

Aqua injectabile	Braun, Melsungen, Deutschland
BSA (Albumine Bovine Fraction IV)	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (nicht acetyliert)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FCS	Seromed, Berlin, Deutschland
NaN <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
PFA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Tab. 9: Substanzen

### 9.1.4 Puffer und Medien

Das aus Blut von Rinderföten hergestellte fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren im Wasserbad bei 56 °C für 30 Minuten erwärmt. Die Herstellung der verwendeten Puffer und Medien ist in Tabelle 10 schematisch dargestellt.

Name	Ingredienz	Menge
FACS-Puffer	BSA NaN <sub>3</sub> 10 % PBS FCS	2,5 mg 3,5 ml 500 ml 25 ml
Lysing-Solution	BD-Lysing Solution 10-fach Aqua dest.	50 ml 450 ml
NaN <sub>3</sub> 10 %	NaN <sub>3</sub> PBS	10 g 100 ml
PFA 4 %	PFA PBS Lösen im Wasserbad bei pH-Wert: 7,4-7,6	8 g 200 ml
PFA 1 %	PFA 4 % PBS	25 ml 75 ml

Tab. 10: Herstellung der Puffer und Medien

### 9.1.5 Monoklonale Antikörper

Antikörper	Klon	Firma
CD14 PerCP	M-Phi-P9	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD16 APC	3G8	Caltag, Hamburg, Deutschland
CD86 PE	HA5.2B7	Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD143 FITC	9B9	Serotec, Düsseldorf, Deutschland

CD3 APC	SK7	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD8 PerCP	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD4 PE	RPA-T4	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD28 FITC	15E(CLB-408)	Caltag, Hamburg, Deutschland
CD19 PerCP	SJ25C1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
NK/B-Mix: CD3 FITC; CD56/CD16 PE	SK7; B73.1/Mφ31	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD4 APC	SK3	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tab. 11: Monoklonale Antikörper (murine Antikörper gegen humane Antigene)

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Abkürzungsverzeichnis	Seite 5
Tab. 2:	Computerprogramme	Seite 24
Tab. 3:	Charakteristika der Studienpopulation	Seite 27
Tab. 4:	Charakteristika der Studienteilnehmer nach Stratifikation anhand des intradialytischen Abfalles der CD14++CD16+ Monozytenzellzahlen	Seite 29
Tab. 5:	Charakteristika der Studienteilnehmer nach Stratifikation anhand des intradialytischen Abfalles der CD14+CD16+ Monozytenzellzahlen	Seite 30
Tab. 6:	Prädiktoren des ereignisfreien Überlebens	Seite 34
Tab. 7:	Geräte	Seite 52
Tab. 8:	Verbrauchsmaterialien	Seite 53
Tab. 9:	Substanzen	Seite 53
Tab. 10:	Herstellung der Puffer und Medien	Seite 54
Tab. 11:	Monoklonale Antikörper	Seite 54/55

---

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

---

- Abb. 1: Repräsentatives Beispiel von Verteilung der Monozytensubpopulationen bei einem Hämodialysepatienten und einem altersgleichen nierengesunden Probanden Seite 24
- Abb. 2: Dialyse-induzierter Abfall der zirkulierenden Leukozyten nach Subpopulationen Seite 28
- Abb. 3: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16+ Monozyten Seite 31
- Abb. 4: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14+CD16+ Monozyten Seite 32
- Abb. 5: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14+CD16- Monozyten Seite 33
- Abb. 6: Ereignisfreies Überleben der Hämodialysepatienten nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14++CD16+ Monozyten Seite 34
- Abb. 7: Prozentuale Darstellung der Patienten, welche während der Nachbeobachtungsphase ein kardiovaskuläres Ereignis erleiden, in Abhängigkeit von der Anzahl prädialytischer CD14++CD16+ Monozyten und von der Höhe des intradialytischen Abfalls der CD14++CD16+ Monozyten Seite 35



- Abb. 8: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten Seite 36
- Abb. 9: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten Seite 37
- Abb. 10: Zeitpunkt bis zur ersten Krankenhausaufnahme aufgrund einer infektiösen Erkrankung nach Stratifizierung anhand des intradialytischen Sturzes der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten Seite 38

## 9.4 Fragebogen

---

Fragebogen basierend auf Rose, G. A.; Cardiovascular survey methods, Second Edition Geneva: WHO, 1982

Untersuchungsdatum \_\_. \_\_. 20\_\_

Proband \_\_\_\_\_ Geburtsdatum \_\_\_\_\_ Geschlecht \_\_\_\_\_

Körpergröße ohne Schuhe \_\_\_\_\_

Körpergewicht leicht bekleidet \_\_\_\_\_

01. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?

O Ja

O Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)

02. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls Nein, weiter mit Frage 9*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

03. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

04. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

O Ich halte an oder laufe langsamer

O Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 9*)

*Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen.*

05. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

O Es kommt zu einer Erleichterung

O Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)

06. Wie rasch?

O Innerhalb von 10 Minuten.

O Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).

07. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

O Sternum (oberes oder mittleres Drittel)

O Sternum (unteres Drittel)

O Linksseitige vordere Brustwand

O Linker Arm

*(alle Angaben notieren)*

08. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonst wo?

O Ja (*notieren wo \_\_\_\_\_*)

O Nein

09. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes, der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

O Ja

O Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Bein?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (*weiter Frage 19*)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen

bekommen?

Ich halte an oder laufe langsamer

Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 19*)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

Es kommt zu einer Erleichterung

Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 19*)

18. Wie rasch?

Innerhalb von 10 Minuten.

Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

Ja

Nein

20. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

Ja

Nein

21. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

Ja

Nein

22. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

Ja

Nein

23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?

O Ja

O Nein

24. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?

O Ja

O Nein

25. Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?

O Ja

O Nein

26. Haben Sie jemals geraucht?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 31*)

27. Rauchen Sie aktuell?

O Ja (*weiter mit Frage 28a*)

O Nein (*nur Frage 28*)

28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht? \_\_\_\_\_

- 28a. Blutentnahme Uhrzeit \_\_\_\_\_

- 28b. Letzte Zigarette vor Blutentnahme \_\_\_\_\_

- 28c. Insgesamt Anzahl Zigaretten vor Blutentnahme \_\_\_\_\_

29. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht? \_\_\_\_\_

30. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich am Tag geraucht? \_\_\_\_\_

31. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor der 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

32. Hat eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

33. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 35*)

34. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

O Insulin

O Blutzuckersenkende Tabletten

O Diät

35. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mindestens 30 Minuten sportlich in einem Ausmaß, dass Sie ins Schwitzen kommen?

\_\_\_\_\_ (*falls „0“, weiter Frage 37*)

36. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

\_\_\_\_\_

37. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern?

O Ja

O Nein

38. Welche Nierenerkrankung ist bei Ihnen bekannt?

\_\_\_\_\_

- 
39. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wie viele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 350 ml Bier, 120 ml (ein „Achtel“) Wein oder 45 ml Spirituosen als ein

Glas Alkohol.

Gesamt \_\_\_\_\_ Gläser

Bier \_\_\_\_\_ Gläser

Rotwein \_\_\_\_\_ Gläser

Weißwein \_\_\_\_\_ Gläser

Spirituosen \_\_\_\_\_ Gläser

40. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?

O Ja

O Nein

41. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

\_\_\_\_\_

---

Nach 5 Minuten Ruhe

RR \_\_\_\_ / \_\_\_\_ rechts \_\_\_\_ / \_\_\_\_ links

HF \_\_\_\_

## **10 CURRICULUM VITAE**

---

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der Online-Version nicht veröffentlicht.