

Aus dem Universitätsklinikum des Saarlandes

Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten – Homburg

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. D. Fliser

Effekte von Hämodiafiltration auf den C1 Metabolismus und Monozytenheterogenität

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von

Anne Irmgard Michel

Meinen Eltern

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Zusammenfassung.....	10
1.1 Deutsche Zusammenfassung	10
1.2 Summary.....	12
2.1 Dialyse zur Therapie der chronischen Nierenerkrankung.....	15
2.2 Die Hämodiafiltration	16
2.3 Kardiovaskuläre Morbidität von Dialysepatienten	16
2.4 Monozytenheterogenität.....	18
2.5 Die Rolle von Monozytensubpopulationen bei der Entstehung der Atherosklerose	19
2.6 C1 Metabolismus und Monozytenheterogenität.....	20
2.7 Fragestellung/Ziel der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1 HD/HDF Studie	22
3.1.1 Studienteilnehmer.....	22
3.1.2 Einverständniserklärung	22
3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	22
3.1.4 Definitionen spezieller Patientencharakteristika	23
3.1.5 Ablauf der HD/HDF Studie	23
3.1.6 Follow Up zur Erhebung des kardiovaskulären Outcomes.....	24
3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von Monozytensubpopulationen.....	25
3.2.1 Durchflusszytometrie.....	25
3.2.2 Färbung von Monozyten im Vollblut	25
3.3 Bestimmung von S-Adenosylmethionin (SAM), S-Adenosylhomocystein (SAH) sowie Homocystein.....	26
3.4 Statistik	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Patientencharakteristika.....	28
4.2. Änderungsraten des Blutdrucks während der Nierenersatzbehandlung (HD, HDF)	30
4.3 Charakterisierung der Monozytensubpopulationen	32
4.3.1 Monozytensubpopulationen in der Gesamtkohorte.....	32

4.3.2 Monozytensubpopulationen und Nierenersatzverfahren	38
4.4 Charakterisierung des C1 Metabolismus in der HD/HDF Studie	40
4.4.1 Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin in der Gesamtkohorte	40
4.4.2 Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin und Nierenersatzverfahren	45
4.5 Assoziation spezifischer Parameter der HDF Behandlung mit Monozytensubpopulationen und C1 Metaboliten.....	49
4.5.1 Unterschiede zwischen Prä- und Postdilutionsmodus	49
4.5.2 Konvektionsvolumen, Filtrationsvolumen und Substitutionsvolumen	55
4.6 Längsschnittanalyse	55
4.6.1 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit kardiovaskulären Risikofaktoren und dialysespezifischen Faktoren	55
4.6.2 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit der Verteilung von Monozytensubpopulationen.....	58
4.6.3 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit Plasmaspiegeln der C1 Metaboliten.....	59
5. Diskussion.....	61
5.1 Einleitung.....	61
5.2 HD versus HDF.....	62
5.2.1 Baselinecharakteristika	62
5.2.2 Monozytensubpopulationen	63
5.2.3 C1 Metaboliten.....	66
5.2.4 5-mc DNA Methylierung	69
5.4 Sonstige Effekte	69
5.4.1 Blutdruckdifferenzen während HD und HDF Behandlung.....	69
5.5 HDF spezifische Faktoren	71
5.5.1 HDF Modalität und Konvektionsvolumen.....	71
5.6 Limitationen.....	72
5.7 Zusammenfassung/Ausblick.....	74
6. Literaturverzeichnis	76
7. Publikation/Posterpräsentationen/Danksagung	87
7.1 Publikation.....	87
7.2 Posterpräsentationen.....	87
8. Anhang.....	89
8.1 Einverständniserklärung	89

8.2 Datenschutzerklärung.....	91
8.3 Fragebogen	92
8.4 Arbeitsablauf Labor	97

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR2	C-C Chemokine Receptor Type 2
CD	Cluster of Differentiation
CFU-/ GM	Colony Forming Unit-/Granulocyte, Monocyte
CKD	Chronic Kidney Disease; Chronische Nierenerkrankung
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CONTRAST	CONvective TRANsport STudy
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular Disease; Kardiovaskuläre Erkrankungen
CVE	Kardiovaskuläres Ereignis
CX ₃ CR1	CX3C Chemokine Receptor 1 (Fractalkine receptor)
C1-Metabolismus	Ein-Kohlenstoff-Metabolismus
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoff-Synthase
ESHOL	EStudio de Supervivencia de Hemodiafiltración On-Line
FCS	Flow Cytometry Staining Buffer
FITC	Fluorescenisothiocyant
FPIA	Fluoreszenzpolarisations-Immunassays
FSC	Forward-Scatter

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HDF	Hämodiafiltration
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-Like Low-Density Lipoprotein Receptor-1
MCSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum Saarpfalz (Dialysezentrum)
NaN ₃	Natriumazid
NI	Niereninsuffizienz
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	Peritonealdialyse
PE	Phycoerythrin
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR dia	Diastolischer Blutdruck
RR sys	Systolischer Blutdruck
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein Hydrolase
SAM	S-Adosylmethionin
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
SSC	Sideward-Scatter

THF

Tetrahydrofolsäure

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Effekte von Hämodiafiltration auf den C1 Metabolismus und Monozytenheterogenität

Hintergrund:

SAH (S-Adenosylhomocystein) konnte in Vorarbeiten als neuer kardiovaskulärer Risikofaktor von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (chronic kidney disease; CKD) herausgestellt werden. SAH wird vor allem renal eliminiert, was zu hohen SAH Plasmaspiegeln bei CKD Patienten führt. SAH ist Teil des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus (C1 Metabolismus), hemmt die DNA Methylierung und ist mit einer Verschiebung der Monozytensubpopulationen von CKD Patienten hin zu proinflammatorischen und proatherosklerotischen intermediären Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺) assoziiert. In vorhergehenden Studien wurde durch eine Nierenersatztherapie mittels Hämodiafiltration (HDF) eine Reduktion der CD16 positiven Monozytenzahl beobachtet.

Während die HD auf dem Prinzip der Diffusion basiert, vereint die HDF Konvektion und Diffusion, weshalb ein breiteres Massenspektrum an Stoffen, insbesondere urämischer Toxine eliminiert werden kann. Die bessere Elimination von Urämietoxinen gilt als entscheidender Vorteil der HDF im Gegensatz zur HD. Einzelne Studien suggerieren zudem Vorteile von HDF hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse.

Wir testen nun die Hypothese, dass HDF den SAH Plasmaspiegel und über epigenetische Regulationsmechanismen den Anteil der intermediären Monozyten an den Gesamtmonozyten verringern kann. Sollte diese Hypothese bestätigt werden, könnte die Senkung von SAH und von intermediären Monozyten in einem verminderten kardiovaskulären Risiko unter HDF Behandlung gegenüber HD Behandlung münden.

Methoden:

Wir rekrutierten 88 Patienten mit terminaler CKD, welche mittels Nierenersatztherapie behandelt wurden, in eine Kohortenstudie. 42 Patienten erhielten drei Mal pro Woche eine HD, 46 Patienten drei Mal pro Woche eine HDF. Die Zellzahl der intermediären Monozyten und die Parameter des C1 Metabolismus (Homocystein, SAH, S-Adenosylmethionin (SAM)) wurden vor und nach einer einzelnen Behandlung gemessen, um zu untersuchen, ob diese Parameter einerseits aufgrund eines chronischen Therapieeffekts vor Beginn einer einzelnen Nierenersatztherapie differierten und andererseits HD und HDF aufgrund eines akuten Therapieeffektes unterschiedlich starke intradialytische Veränderungen dieser Parameter

induzieren. In einem Follow Up mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von $1,2 \pm 0,4$ Jahren wurde das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und Todesfälle jedweder Genese erfasst, um zu untersuchen, ob die vor Beginn einer einzelnen Nierenersatztherapie bestimmten Anteile der Monozytensubpopulationen an den Gesamtmonozyten, die vor Behandlungsbeginn bestimmten Parameter des C1 Metabolismus sowie das Ausmaß ihrer intradialytischen Veränderungen, Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse sind.

Ergebnisse:

Zwischen Patienten mit HD und HDF Therapie zeigte sich hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Monozytensubpopulationen und dem Anteil der Gesamtmonozyten an den Leukozyten weder vor noch nach einer einzelnen Behandlung ein signifikanter Unterschied. Während der Behandlung sank zwar der Anteil der intermediären und nichtklassischen Monozyten, die Reduktion war jedoch bei beiden Nierenersatzverfahren vergleichbar groß.

Es konnte hinsichtlich der Plasmaspiegel von Homocystein, SAH und SAM vor und nach der Behandlung kein signifikanter Unterschied herausgestellt werden. Betrachtet man hingegen die Eliminationsraten der einzelnen C1 Metaboliten durch die beiden Nierenersatzverfahren, so zeigt sich, dass die HDF Behandlung geringgradig effektiver SAH eliminieren konnte. Während es bei der HD Behandlung zu einer Reduktion der SAH Plasmaspiegel um $76,8 \pm 8,8$ % kam, lag die Reduktionsrate durch die HDF Behandlung bei $81,3 \pm 8,2$ % ($p=0,016$). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Elimination von Homocystein und SAM, wobei hier knapp die statistische Signifikanz verfehlt wurde (Homocystein: HD: $43,8 \pm 10,4$ %; HDF: $48,1 \pm 10,3$ %; $p=0,053$; SAM: HD: $70,2 \pm 8,7$ %; HDF: $72,5 \pm 9,0$ %; $p=0,233$).

Tendenziell wiesen Patienten, die den primären Endpunkt (kardiovaskuläre Ereignisse und Todesfälle jedweder Genese) erreichten, einen höheren Anteil an klassischen Monozyten und einen niedrigeren Anteil an nichtklassischen Monozyten vor HD oder HDF Behandlung auf, was jedoch nicht signifikant war. Die Werte für die intermediären Monozyten waren für beide Gruppen nahezu identisch.

Patienten, die den Endpunkt erreichten, tendierten sowohl zu niedrigeren Homocystein- als auch SAH Plasmaspiegeln, sowie einem höheren SAM Plasmaspiegel vor der HD oder HDF Behandlung. Die statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

Hinsichtlich der intradialytischen Elimination der C1 Metaboliten und dem primären Endpunkt zeigte sich, dass diejenigen Patienten, die den Endpunkt erreichten, eine tendenziell geringere Reduktionsrate von SAH, Homocystein und SAM Plasmaspiegeln hatten.

Diskussion:

Die Ergebnisse unserer Kohortenstudie suggerieren, dass HDF SAH geringgradig effektiver eliminiert als HD. Hinsichtlich des Anteils der Monozytensubpopulationen an den Gesamtmonozyten vor einer einzelnen Nierenersatzbehandlung und ihrer intradialytischen Veränderungen während der Nierenersatzbehandlung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verfahren gezeigt werden. Ob diese geringgradig bessere Eliminationsrate von SAH bei HDF Behandlung prognostische Relevanz hat, kann nur durch randomisierte Kontrollstudien überprüft werden.

1.2 Summary

Effects of hemodiafiltration on C1 metabolism and monocyte heterogeneity

Background:

Recent studies have identified S-Adenosylhomocysteine (SAH) as a new significant cardiovascular risk factor in patients with chronic kidney disease (CKD). SAH is primarily eliminated by the kidney, which contributes to higher serum SAH levels in the CKD patient population. SAH is part of the C1 metabolism; it inhibits DNA methylation, and it is associated with the distribution of proinflammatory and proatherogenic intermediate monocytes (CD14⁺⁺CD16⁺).

In renal replacement therapy, we can differentiate between two alternative methods: Hemodialysis (HD) and Hemodiafiltration (HDF). The function of HD is based on diffusion, while HDF combines both convection and diffusion, which allows for elimination of molecules with a wider mass spectrum. Some previous clinical studies suggest an advantage of HDF over HD with regard to the incidence of cardiovascular events.

We hypothesize that HDF lowers serum levels of SAH and subsequently intermediate monocyte counts in CKD patients. Should this hypothesis be confirmed, lower serum SAH and fewer intermediate monocytes could translate into a decreased cardiovascular risk in CKD patients undergoing HDF as compared to HD.

Methods:

We recruited 88 patients on renal replacement therapy into our cohort study. 42 patients were treated three times a week with HD and 46 patients were treated three times a week with HDF. We then measured the percentage of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes among all monocytes

and parameters of C1 metabolism (homocysteine, SAH, S-Adenosylmethionine [SAM]) before and after a single treatment session. We analyzed (a) differences in these parameters before a single treatment session, which would reflect chronic effects of the two distinct treatment modalities, and (b) differences in the intradialytic changes of these parameters, which would reflect a difference in acute effects of these two treatment facilities.

During 1.2 ± 0.4 years of follow-up, we recorded cardiovascular events and all-cause mortality in our patient population. We analyzed whether CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and serum levels of C1 metabolism before the single treatment session, and their intradialytic changes predict cardiovascular events in our CKD patients.

Results:

There was neither significant difference in the relative distribution of monocyte subpopulations, nor in the percentage of monocytes among all leukocytes before or after treatment between patients on HD and HDF. During treatment the percentages of intermediate and non-classical monocytes decreased, however this decrease did not differ significantly between HD and HDF.

The plasma levels of homocysteine, SAH and SAM before and after a single treatment session were similar among HD and HDF patients.

With regard to intradialytic elimination rates of C1 metabolites, SAH was slightly better eliminated with HDF (-81.3 ± 8.2 %; $p=0.016$) compared to HD (-76.8 ± 8.8 %).

The elimination rates of homocysteine and SAM also showed the same trend, but were not statistically significant (homocysteine: HD: -43.8 ± 10.4 %; HDF: -48.1 ± 10.3 %; $p=0.053$; SAM: HD: -70.2 ± 8.7 %; HDF: -72.5 ± 9.0 %; $p=0.233$).

Patients who reached the primary endpoint (cardiovascular events and all-cause mortality) tended to have a higher percentage of classical monocytes and a lower percentage of non-classical monocytes before the HD or HDF treatment session than patients who did not reach the primary endpoint, although this difference was not statistically significant. The percentage of intermediate monocytes did not differ between the two groups. In addition, patients who reached the primary endpoint tended to have lower homocysteine plasma levels, lower SAH plasma levels and higher SAM plasma levels before the HD or HDF treatment session as compared to patients who did not reach the primary endpoint, although this difference was not statistically significant.

Finally, patients who reached the primary endpoint tended to have a lower intradialytic elimination of plasma SAH, homocysteine and SAM.

Discussion:

Our cohort study showed that HDF is minimally more efficient at eliminating SAH compared to HD. The distribution of monocyte subpopulations at baseline and during dialysis treatment did not differ between HD and HDF. The prognostic value and therapeutic implications of these findings should be further investigated in randomized controlled studies.

2. Einleitung

2.1 Dialyse zur Therapie der chronischen Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung im Endstadium führt ohne Therapie zur Akkumulation urämischer Toxine, Blutdruckentgleisungen, Veränderungen zirkulierender Blutzellen und einer Fehlregulation des Wasserhaushaltes. Um der Akkumulierung urämischer Toxine im Blut chronisch nierenkranker Patienten entgegenzuwirken, entwickelte John Jacob Abel 1913 im Tierversuch das erste extrakorporale Nierenersatzverfahren. Er nannte sein Verfahren zunächst „Vividiffusion“, später wurde sein Versuchsaufbau als „künstliche Niere“ bezeichnet [1, 2]. Thomas Graham, der Erstbeschreiber der Diffusion über eine semipermeable Membran führte den Begriff „Dialyse“ ein [3, 4]. John Abels Erkenntnisse über die Dialyse und die Beschreibung von Kolloidmembranen durch Fritz Pregl [5] veranlassten Georg Haas dazu, hochexplosive Schießbaumwolle (Cellulosenitrat) als Filter in eine Bluttransfusionspumpe einzubauen. Diese Pumpe wurde zwischen die Arterie und den Dialysator geschaltet, um den Widerstand des in die Vene zurückfließenden Blutes überwinden zu können [6]. Im Jahre 1924 wurde von Georg Haas die erste fünfzehnminütige Dialysesitzung an einem chronisch nierenkranken Menschen im Endstadium durchgeführt [7]. Diese verbesserte den gesundheitlichen Zustand des Patienten wesentlich. 1928 wies Georg Haas im Dialysat von drei „Blutwaschungen“ ausgewaschene urämische Toxine (Indican, Kreatinin, Phenol) nach und konnte damit die Wirksamkeit der Dialyse bestätigen [8, 9]. Erst ungefähr 20 Jahre später wurde in den Niederlanden mit dem Trommeldialysegerät von Willem Kolff erneut eine Patientin mit akutem Nierenversagen dialysiert [10]. Essentiell war zudem die Erstbeschreibung von Hirudin als potenter Blutverdünner durch John B. Haycraft, das schon von John Abel verwendet wurde, jedoch äußerst toxisch ist [11]. 1925 wurde erstmals gereinigtes Heparin als geeignetes Antikoagulanzen eingeführt und durch Georg Haas 1927 in einer Dialysesitzung verwendet [12, 13]. Sowohl die besser verträgliche Antikoagulation als auch die Erfindung des arteriovenösen Shunts [14] trugen im Wesentlichen dazu bei, dass die Hämodialyse neben der Peritonealdialyse und der Nierentransplantation ein Standardverfahren zum Nierenersatz werden konnte. Der erste Dialysepatient mit arteriovenösem Shunt und Heparinantikoagulation überlebte die Dialysebehandlung über einen Zeitraum von elf Jahren [15].

2.2 Die Hämodiafiltration

Lee W. Henderson erfand im Jahre 1967 die Hämodiafiltration (HDF). Die HDF ist ein extrakorporales Nierenersatzverfahren, in dem Diffusion der herkömmlichen Hämodialyse (HD), welche insbesondere die Elimination von kleinmolekularen Molekülen erlaubt, und Konvektion der Ultrafiltration, welche speziell die Elimination von mittelmolekularen Molekülen ermöglicht, kombiniert werden. Die Ultrafiltration wurde ursprünglich vor allem zur Eliminierung übermäßigen Körperwassers genutzt [16]. Die Kombination beider Verfahren ermöglicht, ein größeres Massenspektrum von Molekülen effizienter zu eliminieren als mit einer Modalität allein [17, 18]. Im Jahre 1977 wurde die HDF nach erfolgreicher Durchführung an vier Patienten als weiteres Nierenersatzverfahren vorgestellt. Zudem konnte über eine bessere Steuerbarkeit des Blutdruckes während der HDF Behandlung berichtet werden [19, 20]. Durch Ultrafiltration wird der gewünschte Flüssigkeitsverlust überstiegen, weshalb dem Patienten eine Austauschlösung (Substitutionslösung) reinfundiert wird. Hierdurch soll die Balance des Flüssigkeitshaushalts des Patienten gewährleistet werden [17].

Es gibt verschiedene Versionen einer HDF. Die Substitutionslösung kann entweder vor dem Diafilter im Prädilutionsmodus oder nach dem Diafilter im Postdilutionsmodus reinfundiert werden [21]. Durch eine sogenannte On-Line Produktion kann direkt in der Dialysemaschine eine unbegrenzte Menge an sterilem Dialysat hergestellt werden. Die Substitutionslösung wird bei On-Line Produktion aus dem Dialysat hergestellt und in der Maschine so gereinigt, dass sie als sterile, „ultrapure“ Substitutionslösung verwendet werden kann [22, 23]. Das Konvektionsvolumen kann bei der HDF 25 bis 60 l pro Behandlung betragen, ist aber abhängig davon, ob die HDF im Prädilutionsmodus oder Postdilutionsmodus abläuft [24]. Das höhere Konvektionsvolumen führt zu einer besseren Eliminierung von Urämietoxinen durch HDF [25]. Als Grundlage der HDF dienen Membranen aus synthetischen Polymeren oder hochmodifizierten Stoffen auf Cellulosebasis [17].

2.3 Kardiovaskuläre Morbidität von Dialysepatienten

Chronisch nierenkranke Patienten haben ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [26, 27], welches nicht allein aus dem Einwirken traditioneller Risikofaktoren resultiert. Vielmehr treten CKD-spezifische Risikofaktoren hinzu. So kommt es bei einer chronischen Nierenerkrankung häufig zu einer endothelialen Dysfunktion. Die Relaxation von Arteriolen, welche vor allem Stickstoffmonoxid (NO) induziert, ist bei chronisch nierenkranken Menschen supprimiert. Bei chronisch Nierenkranken kommt es zu einer Akkumulation von

Stoffen wie zum Beispiel Homocystein, Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), Glykolierungsendprodukten und Prooxidantien, die die NO Produktion über eine Entkopplung der endothelialen NO Synthase (eNOS) herunterregulieren und die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fördern. Die Inhibition von eNOS führt zu einer Umwandlung von endothelialen Zellen in mesenchymale Zellen. Diese Umwandlung führt zu Sauerstoffmangel im Gewebe sowie fibrotischem Umbau [28]. Das ADMA induziert eine Überexpression von Lectin-Like Low-Density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1), dem Rezeptor für oxidiertes Low Density Lipoprotein (LDL), was eine Anhäufung von oxidiertem LDL und damit eine vermehrte Bildung von Schaumzellen zur Folge hat [29, 30]. Diese Prozesse führen wiederum zu beschleunigter Atherosklerose und einem erhöhten Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden.

Die hohe kardiovaskuläre Morbidität nierenkranker Menschen gab Anlass, den Einfluss spezifischer Nierenersatzverfahren auf das Auftreten und die Progredienz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu untersuchen. Man erhoffte sich von der effektiveren Elimination von mittelmolekularen Urämietoxinen durch die HDF gegenüber der HD einen Benefit auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse; allerdings bleibt die Studienlage hier bislang uneinheitlich. Die prospektive CONTRAST Studie (CONvective TRANsport STudy) untersuchte an 714 Patienten mit Nierenersatzbehandlung die Unterschiede zwischen On-Line-Postdilution HDF und low-flux HD hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse, ohne dass signifikante Unterschiede aufgezeigt werden konnten. Post Hoc Analysen zeigten jedoch, dass innerhalb der Patienten, welche in den HDF Arm randomisiert wurden, die Höhe des Konvektionsvolumens mit einer signifikant niedrigeren Mortalität assoziiert war [31].

Auch in der prospektiven On-Line HDF Studie (Turkish On-Line Hemodiafiltration Study) konnte keine statistisch signifikante Überlegenheit von On-Line-Postdilution HDF versus high-flux HD hinsichtlich kardiovaskulärer Mortalität und Mortalität jedweder Genese herausgestellt werden. Jedoch zeigten Patienten, die während ihrer On-Line-HDF Behandlung das höchste Substitutionsvolumen erhielten (über 17,4 l), erneut ein signifikant besseres Überleben und hatten signifikant weniger kardiovaskuläre Ereignisse als Patienten, die ein geringeres Substitutionsvolumen erhielten [32].

Im Gegensatz dazu zeigte die prospektive ESHOL Studie (EStudio de Supervivencia de Hemodiafiltracion On-Line), dass Patienten in der HDF On-Line Postdilution Gruppe eine

signifikant geringere kardiovaskuläre Mortalität und Gesamtmortalität hatten, als Patienten unter konventioneller HD Behandlung [33, 34].

Derzeit wird diskutiert, welche Mechanismen für den möglichen Überlebensvorteil der HDF Behandlung verantwortlich sein könnten. Ein zentraler Aspekt ist die bessere Elimination eines breiteren Spektrums urämischer Toxine durch die HDF Behandlung. Diese bessere Elimination könnte urämische Toxine umfassen, die direkt an der persistierenden Inflammation chronisch nierenkranker Menschen als zentraler Wegbereiter der Atherogenese dieser Patienten beteiligt sind [35, 36].

Neben der Akkumulation von proinflammatorischen, löslichen Urämietoxinen sind Veränderungen in der Funktion und Zellzahl von Monozyten bei der persistierenden Inflammation chronisch nierenkranker Menschen von entscheidender Rolle und stellen einen möglichen Pathomechanismus in der beschleunigten Atherogenese dieser Patienten dar [37-39].

2.4 Monozytenheterogenität

Monozyten sind Blutzellen der myeloischen Reihe, die von einer Progenitorzelle (CFU-G/M) des Knochenmarks abstammen [40, 41]. Nachdem sie 1-3 Tage im Gefäßsystem zirkulieren, differenzieren sie sich zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen [42, 43].

Humane Monozyten lassen sich durchflusszytometrisch aufgrund ihrer differentiellen Expression der Oberflächenmarker CD14 (Lipopolysaccharid Korezeptor) und CD16 (Fcγ-III Rezeptor) in drei Subpopulationen unterteilen: klassische (CD14⁺⁺CD16⁻) Monozyten, intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) Monozyten und nichtklassische (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten. Intermediäre und nichtklassische Monozyten können als CD16 positive Monozyten zusammengefasst werden [44, 45]. Mit Hilfe ihrer Oberflächenmarker unterschied Passlick im Jahre 1989 erstmals Monozytensubpopulationen [46]; zunächst wurden sie in kleine (CD14⁺CD16⁺) Monozyten und reguläre (CD14⁺⁺) Monozyten unterteilt. Im weiteren Zeitverlauf wurden die CD16 positiven Zellen als proinflammatorische Monozyten beschrieben [47]. Lange herrschte Uneinigkeit über die Nomenklatur der Monozyten, da im Mausmodell alternative Monozytenoberflächenmarker (CCR2, CX₃CR1, Gr1(Ly6c)) beschrieben wurden und uneinheitliche Nachweistechiken zur Differenzierung humaner Monozytensubpopulationen verwendet wurden. Erst 2010 wurde die offizielle Nomenklatur für die Monozytensubpopulationen eingeführt [44].

2.5 Die Rolle von Monozytensubpopulationen bei der Entstehung der Atherosklerose

Den Monozyten wird eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose zugeschrieben.

Als proinflammatorische Zellen beeinflussen Monozyten die Atherogenese schon im Anfangsstadium. Risikofaktoren wie zum Beispiel arterielle Hypertension, Hyperglykämie und Rauchen sowie proinflammatorische Mediatoren wie beispielsweise TNF α und IL1 β führen zunächst zu subklinischen, initialen Endothelläsionen, worauf die betroffenen Endothelzellen aktiviert werden [36, 48-52]. Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion beginnen die Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle wie Selectin Liganden und Integrin Liganden zu exprimieren [53, 54], an welche zirkulierende Monozyten adhären, um schließlich in den subendothelialen Raum (Tunica intima) zu migrieren. Hier differenzieren sie sich entweder zu Dendritischen Zellen oder unter dem Einfluss von MCSF zu Makrophagen. Die Makrophagen können ebenfalls proinflammatorische Zytokine sezernieren, die zu einer perpetuierenden Rekrutierung von T-Zellen und Monozyten führen. Der Kern atherosklerotischer Plaques wird von Schaumzellen gebildet. Diese Schaumzellen entstehen aus Makrophagen, welche Lipoproteinpartikel phagozytiert haben. Zusätzlich wandern glatte Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima ein, was in der Plaque zu fibrotischen Umbauprozessen führt. Die Rekrutierung und Einwanderung neuer Immunzellen und die Anhäufung lipidreicher Masse destabilisieren die Plaque zunehmend und führen schlussendlich zur Plaqueruptur [55, 56], was sich klinisch beispielsweise als Myokardinfarkt oder Apoplex manifestieren kann.

Sowohl bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit [57] als auch bei hämodialysepflichtigen Patienten [58] konnten höhere Zellzahlen der CD16 positiven Monozyten nachgewiesen werden. Insbesondere wurde den intermediären Monozyten eine wichtige Rolle in der Atherogenese zugesprochen, da diese sich als Prädiktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen sowohl bei chronisch nierenkranken Patienten [59-62] als auch bei kardiovaskulären Risikopatienten, die sich einer elektive Koronarangiographie unterzogen, erwiesen [63].

Auf Basis dieser Untersuchungen werden die intermediären Monozyten als mögliche therapeutische Ziele in der kardiovaskulären Medizin diskutiert [56]. Deshalb wird aktuell nach Möglichkeiten geforscht, die intermediären Monozyten selektiv zu depletieren. Bislang erwies sich jedoch bei Dialysepatienten einzig der Wechsel von HD auf HDF effektiv, die intermediären Monozytenzahlen zu reduzieren [64].

2.6 C1 Metabolismus und Monozytenheterogenität

Eine mögliche Ursache, wieso HDF Patienten eine geringere Zellzahl an intermediären Monozyten aufweisen, könnte die bessere Elimination von C1 Metaboliten (Homocystein, S-Adenosylhomocystein (SAH), S-Adenosylmethionin (SAM)) sein, die als Mediatoren für die Verschiebung von klassischen Monozyten zu intermediären Monozyten diskutiert werden [65, 66].

So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass eine Hyperhomocysteinämie zu einer vermehrten Bildung intermediärer Monozyten führt. Zudem waren die erhöhten Homocysteinspiegel mit vermehrtem oxidativen Stress und beschleunigter Migration der intermediären Monozyten in die atherosklerotischen Läsionen assoziiert [65, 67]. Ein hoher Homocysteinspiegel führt zu einer verstärkten Inflammation in den Gefäßwänden und einer Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen [66].

In zahlreichen klinischen Studien wurde Homocystein als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert. Die Hyperhomocysteinämie bei nierenkranken Patienten kommt zum einen durch eine gestörte Metabolisierung, aber auch die reduzierte Ausscheidung von Homocystein zustande [68-70]. Interessanterweise konnte in großen Interventionsstudien, in denen Homocystein mittels B Vitaminen gesenkt wurde, kein substantieller Benefit erreicht werden [71-81].

Vor diesem Hintergrund erscheint bedeutsam, dass chronisch erhöhte Homocysteinspiegel im Blut zu einer Erhöhung der SAH Plasmaspiegel [82], eine Reduktion der Homocysteinspiegel mit Vitamin B und Folsäure SAH aber keineswegs senkt [83, 84].

Darüber hinaus konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass jene Versuchstiere mit hohen SAH Spiegeln atherosklerotische Läsionen entwickelten [85]. Weitere experimentelle Studien konnten zeigen, dass SAH zur Apoptose endothelialer Zellen führt und die Proliferation glatter Muskelzellen anregt, was mit einer gesteigerten Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert war [86, 87].

In klinisch-epidemiologischen Studien hatten Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen höhere SAH Plasmaspiegel als Patienten ohne kardiovaskuläre Erkrankungen; außerdem korrelierten die SAH Plasmaspiegel positiv mit der Höhe des Plasma Kreatinin Wertes [88, 89]. In der I Like HOME Studie wurde bei gesunden Probanden ein Zusammenhang zwischen subklinischer Atherosklerose und traditionellen Risikofaktoren für die Atherosklerose, sowie einer reduzierten Nierenfunktion mit erhöhten SAH Plasmaspiegeln gezeigt [90]. Auch bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zeigte sich eine Assoziation der SAH

Plasmaspiegel mit kardiovaskulären Erkrankungen [91]. Dabei ist von besonderem Interesse, dass die Niere ein zentrales Organ für die Elimination von SAH ist [91, 92]. Eine erste prospektive Studie an Patienten, die sich einer elektiven Koronarangiographie unterzogen, zeigt, dass SAH sogar ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse ist [85, 93]. Deshalb wird aktuell diskutiert, ob SAH und nicht Homocystein der kausale Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen sein kann [91, 94].

Da die Supplementation von Folsäure und Vitamin B12 nur die Homocysteinspiegel, nicht aber den SAH Spiegel senken kann, ist es von zentraler Bedeutung, mögliche Interventionen zu identifizieren, die den SAH Plasmaspiegel senken können.

2.7 Fragestellung/Ziel der Arbeit

Obschon die ESHOL-Studie ein Überlebensvorteil für HDF gegenüber HD aufzeigen konnte, bleiben die zugrundeliegenden Mechanismen für diesen prognostischen Benefit aktuell größtenteils unklar.

Vor diesem Hintergrund fokussiert die vorliegende Arbeit auf die zwei zentralen nicht-klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren Inflammation und Dysregulation des C1 Metabolismus. Es soll zunächst die Hypothese überprüft werden, dass HDF im Vergleich zu HD mit niedrigeren intermediären Monozytenzahlen und niedrigeren SAH Werten im Blutplasma einhergeht. Dazu sollen in eine klinische Kohortenstudie Patienten mit Nierenersatzbehandlung, die entweder mittels HD oder HDF behandelt werden, eingeschlossen werden und Zellzahlen der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten sowie Parameter des C1 Metabolismus (SAH, SAM, Homocystein) vor Beginn einer einzelnen Therapie bestimmt werden. Außerdem soll innerhalb dieser Kohorte die Hypothese überprüft werden, dass eine einzelne HDF Behandlung eine stärkere Elimination von Parametern des C1 Metabolismus erlaubt. Dazu sollen diese Parameter jeweils vor und nach einer Behandlung bestimmt werden.

Schließlich soll prospektiv das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei dem Patientenkollektiv erfasst werden.

3. Material und Methoden

3.1 HD/HDF Studie

3.1.1 Studienteilnehmer

Im Zuge dieser Dissertationsarbeit wurden vom 03.02.2014 – 31.03.2015 chronisch nierenkranke, dialysepflichtige Patienten untersucht. Die Patienten wurden in dem Dialysezentrum des Medizinischen Versorgungszentrum Saarpfalz in Homburg sowie in der Inneren Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes – Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten auf der Station M4.03 zur Nierenersatzbehandlung vorstellig.

3.1.2 Einverständniserklärung

Vor Studienbeginn wurden die Patienten über die HD/HDF Studie aufgeklärt. Die Patienten wurden ausführlich mündlich und schriftlich (siehe Anhang Einverständniserklärung) über den Inhalt und das Ziel der HD/HDF Studie, den Ablauf am Studientag und über den Datenschutz informiert. Der Studieneinschluss eines Patienten erfolgte, wenn eine Bereitschaft zur Untersuchung bestand und diese mit einem Ankreuzen sowie einer Unterschrift bestätigt wurde und zusätzlich die Kenntnisnahme der Datenschutzerklärung unterschrieben wurde.

3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Eignung zur Studienteilnahme wurde mit den zuständigen Nephrologen sowohl vor der Aushändigung der Einverständniserklärung als auch bei der Vorbereitung der Messungen für die Studie überprüft. Die folgenden Kriterien mussten für den Studieneinschluss erfüllt sein:

- Schriftliches Einverständnis
- Nierenersatztherapie seit > 3 Monaten
- Drei Hämodialyse oder Hämodiafiltrations Behandlungen pro Woche
- Keine Konversion von Hämodiafiltration auf Hämodialyse oder von Hämodialyse auf Hämodiafiltration in den vorherigen vier Wochen
- Keine Veränderung der Dialysezeit oder des Blutflusses in den vorherigen 14 Tagen
- Keine systemische Immunsuppression

3.1.4 Definitionen spezieller Patientencharakteristika

Als Raucher wurden Patienten definiert, die in den letzten 28 Tagen vor Befragung mindestens eine Zigarette geraucht hatten.

Als Diabetiker galten Patienten, deren Diabetes mellitus auf dem Patientendeckblatt durch einen Arzt vorbeschrieben wurde, die in der Eigenanamnese einen Diabetes mellitus angaben, entsprechende blutzuckersenkende Medikation erhielten, nüchtern einen Blutzucker von > 126 mg/dl oder einen Spontan-Blutzucker von > 200 mg/dl aufwiesen.

Eine positive Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse wurde den Patienten attestiert, deren Verwandte 1. Grades (Eltern oder Geschwister) vor dem 60. Lebensjahr einen Myokardinfarkt oder einen Apoplex erlitten.

3.1.5 Ablauf der HD/HDF Studie

Eine Woche vor einer Messung wurden mögliche Studienteilnehmer anhand der vorliegenden Einverständniserklärungen ausgesucht. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien wurden ein zweites Mal mit Hilfe eines Patientendeckblattes, auf dem die Krankheitsgeschichte des Patienten steht und einer Übersicht über die Medikamenteneinnahme überprüft. Die Bestimmung von Blutparametern wurde in der Laborgemeinschaft Saarpfalz und dem Zentrallabor des Uniklinikums des Saarlandes durchgeführt. Die Monozytensubpopulationen wurden durchflusszytometrisch am Tag des Studieneinschlusses im Labor der Inneren Medizin IV – Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten gemessen. Die SAH/SAM und Homocysteinwerte im Plasma wurden im Zentrallabor des Uniklinikums des Saarlandes bestimmt.

Pro Patient wurden zwei EDTA KE 9 ml Blutröhrchen und vier SERUM 4,7 ml, sowie zwei EDTA KE 2,5 ml Blutröhrchen für die Blutabnahme vor und nach der HD bzw. HDF mit dem Namen und der Nummer und dem Untersuchungsdatum beschriftet. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Laboranforderung über zwei große Blutbilder, zwei Differentialblutbilder sowie Werte der klinischen Chemie ausgestellt.

Am Tag des Studieneinschlusses wurde den Patienten vor Beginn der HD oder HDF Behandlung die Blutproben über den für die Dialyse vorgesehenen Gefäßzugang abgenommen. Ein EDTA KE 9 ml Blutröhrchen und ein Serum 4,7 ml Röhrchen wurden sofort mit Eis gekühlt. Die Kühlung erfolgte im Hinblick auf Messungen von SAH/SAM und Homocystein, um fehlerhafte Werte aufgrund einer möglichen Synthese durch Erythrozyten

auszuschließen. Die Röhren für die Bestimmung eines großen Blutbildes, Differentialblutbildes und Werte der klinischen Chemie wurden vom MVZ in die Laborgemeinschaft Saarpfalz per Kurier geschickt und von Station M4.03 in das Zentrallabor des Uniklinikums des Saarlandes per Rohrpost. Die gekühlten EDTA und Serum Röhren wurden innerhalb von 45 Minuten nach Blutentnahme in das nephrologische Labor der Inneren Medizin IV – Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten gebracht. Dort wurden nach vorsichtigem Schwenken des EDTA KE 9 ml Blutröhrchens 1 ml Vollblut in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß abgefüllt und zweimal 100 µl Vollblut in beschriftete FACS-Röhren pipettiert. Danach wurden alle Blutröhrchen in der Zentrifuge bei 4000 rpm für 7 Minuten zentrifugiert und anschließend 1 ml EDTA Plasma mit 100 µl 1 N Essigsäure versetzt, um eine Degradation von SAM und SAH zu vermeiden. Die restlichen Plasma- und Serumproben wurden aliquotiert und bei -70 °C im Kühlschrank gelagert.

Zusätzlich wurde mit jedem Patienten ein Fragebogen hinsichtlich kardiovaskulärer Komorbiditäten durchgeführt (siehe Anhang Fragebogen).

3.1.6 Follow Up zur Erhebung des kardiovaskulären Outcomes

Am 10.11.2015 wurde in der Heimdialyse und am 17.11.2015 im UKS ein Follow Up bei allen Studienprobanden durchgeführt. Die Daten wurden anhand von aktualisierten Patientendeckblättern und/oder der Auskunft des behandelnden Arztes oder Pflegekraft erhoben. Das Follow Up diente der Erfassung von kardiovaskulären Ereignissen in dem Zeitraum nach erfolgter Messung. Als kardiovaskuläres Ereignis wurde das neue Auftreten folgender Ereignisse gewertet:

- Koronarintervention (PTCA/Stent)
- Myokardinfarkt
- koronarer Bypass
- Carotis TEA
- Apoplex > 24 Stunden
- nicht traumatische Amputation
- peripherer Bypass
- peripherer Stent/PTA
- Tod jedweder Genese

Bei verstorbenen Patienten konnte keine Aussage über das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse im Zeitraum zwischen der Messung und dem Todeszeitpunkt gemacht werden. Die Todesursachen konnten nicht erfasst werden. Der primäre Endpunkt umfasste kardiovaskuläre Ereignisse und Todesfälle jedweder Genese.

3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von Monozytensubpopulationen

3.2.1 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer individuellen Beschaffenheit charakterisiert werden. So können Zellen mit diesem Verfahren auf ihre Größe und ihre Granularität hin untersucht werden. Die in Suspension befindlichen Zellen werden mit monochromatischem Licht eines Lasers angestrahlt und es erfolgt eine Aufzeichnung des durch die Zellen abgegeben Emissionslichts. Dabei gibt das forwardscatter (FSC) Signal ein Maßstab für die Größe der Zelle, während das sidescatter (SSC) Signal Informationen über die Granularität der Zelle liefert. Das FSC detektiert Emissionen der Zelle in einem Winkel von 0 bis 20 °, das SSC in einem Winkel von 90°. Die Messung der Emissionen erfolgt während die sich in Suspension befindlichen Zellen einzeln und mit hoher Geschwindigkeit an dem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Ein Photoelektronenvervielfacher verstärkt die gemessenen Emissionen und wandelt sie schließlich in elektrische Signale um. Zur näheren Untersuchung einer Zelle können zudem spezifische Antikörper verwendet werden, an die Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE), gekoppelt sind. Diese Emissionssignale werden bei verschiedenen Wellenlängen detektiert und sind ein Maß für die Expressionsstärke eines bestimmten Antigens.

3.2.2 Färbung von Monozyten im Vollblut

Monozyten besitzen das panmonozytäre Oberflächenantigen CD86, anhand dessen man sie von anderen Leukozyten unterscheiden kann. Die verschiedenen Monozytensubpopulationen werden aufgrund der Expression der Oberflächenantigene CD14 und CD16 unterschieden.

Für die durchflusszytometrische Messung der Monozytensubpopulationen wurden Monozyten zunächst im Vollblut gefärbt. Hierzu wurden 100 µl Vollblut in ein FACS Röhrchen pipettiert und zunächst mit 2 ml FACS-Puffer (PBS + 5 % FCS + 0,5 % BSA + 0,02 % EDTA + 0,07 % NaN₃) gewaschen. Anschließend wurden die Proben 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 70 µl des folgenden Antikörper-Ansatzes hinzu gegeben:

5 µl anti-CD86 PE

4 µl anti-CD14 PerCP

0,5µl anti-CD16 PeCy7

60,5 µl FACS-Puffer

Nach erneutem Vortexen erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei 4°C. Durch Zugabe von 2 ml Lysingsolution (BD Lysing-Solution + Aqua dest. [1:10]) und Inkubation des Lysepuffers für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Erythrozyten lysiert. Die Proben wurden 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und der erhaltene Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Proben mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 200 µl 1% Paraformaldehyd resuspendiert. Die Probe wurde nochmals gevortext, um dann sofort am Durchflusszytometer gemessen zu werden.

Die Messung der Monozytensubpopulationen erfolgte am BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Die erhaltenen Daten wurden mit der BD FACSDiva™ Software (BD Biosciences) ausgewertet. Die Monozytensubpopulationen wurden danach im sogenannten Gating abgegrenzt. Die Methode für das Gating wurde im Labor der Klinik für Innere Medizin IV etabliert und validiert [62]. Als erstes wurden Zellen, die auf ihrer Oberfläche CD86 exprimieren im SSC/CD86 Plot abgegrenzt, danach im FSC/SSC Dot Plot dargestellt und erneut abgegrenzt. Die Monozytensubpopulationen wurden anschließend anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 in folgende Gruppen eingeteilt:

- CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten: klassische Monozyten
- CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten: intermediäre Monozyten
- CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten: nicht-klassische Monozyten

3.3 Bestimmung von S-Adenosylmethionin (SAM), S-Adenosylhomocystein (SAH) sowie Homocystein

Die Bestimmung von Homocystein sowie von SAM und SAH erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes aus den bei -70°C gelagerten Proben nach Einschluss aller Patienten. Die Messung von Homocystein wurde mit Hilfe des Fluoreszenzpolarisations-Immunassays (FPIA) und einem Abbott AxSYM Analysegerät (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Die Messung von SAM und SAH erfolgte mit dem Waters 2765 Alliance HT HPLC System in Verbindung mit dem Quattro Micro API Tandem Massenspektrometer (Waters Corporation, Milford, Connecticut, USA).

3.4 Statistik

Alle Daten wurden elektronisch mit Microsoft ® Excel erfasst und statistisch mit SPSS (Statistical Product and Service Solutions, PASW Statistics 23, Inc; Chicago; Illinois, USA) ausgewertet.

Stetige Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben; bei kategorialen Variablen wurden die Anzahl und deren prozentualer Anteil an allen Probanden mit dieser Merkmalsausprägung aufgeführt.

Bei stetigen Variablen wurden die Mittelwerte mit Hilfe des T-Tests für zwei unabhängige Stichproben verglichen. Kategoriale Variablen wurden für zwei unabhängige Stichproben mit dem χ^2 Test verglichen. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet. Das statistische Signifikanzniveau aller statistischen Verfahren liegt bei einem p-Wert $\leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

In die HD/HDF Studie wurden insgesamt 88 Patienten mit Nierenersatzbehandlung, die entweder mittels mit Hämodialyse (HD) oder Hämodiafiltration (HDF) behandelt wurden, eingeschlossen. 42 Patienten erhielten eine HD Behandlung und 46 Patienten eine HDF Behandlung. Insgesamt wurden 48 Patienten aus der Dialysepraxis im Medizinischen Versorgungszentrum Saarpfalz („Arbeitsgemeinschaft Heimdialyse Saar e.V.“) rekrutiert und 40 Patienten von der teilstationären Dialysestation der Klinik für Innere Medizin IV, Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Baselinecharakteristika dieses Patientenkollektivs finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Baselinecharakteristika der Patienten mit Nierenersatzbehandlung.

Abkürzungen: BMI: Body Mass Index; NI: Niereninsuffizienz; CVE: kardiovaskuläres Ereignis; CRP: C-reaktives Protein; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdia: diastolischer Blutdruck; RRmittl: mittlerer Blutdruck; Kt/V: Parameter zur Bestimmung der Dialyseeffektivität (K: Harnstoffclearance, t: Dialysezeit, V: 60% der Körpermasse in der das Blut zirkulieren kann (Körperwassergehalt)). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test bzw. dem χ^2 Test.

	Gesamt- kohorte (n=88)	Hämo- dialyse (n=42)	Hämo- diafiltration (n=46)	p
Alter [Jahre]	68 ± 15	70 ± 14	65 ± 16	0,184
Geschlecht [m]	61 (69 %)	24 (57 %)	37 (80 %)	0,022
BMI [kg/m²]	28 ± 6	29 ± 6	26 ± 6	0,063
Raucher [ja]	7 (8 %)	3 (7 %)	4 (9 %)	1,000
Dialysezentrum [Medizinisches Versorgungszentrum Saarpfalz]	48 (55 %)	7 (17 %)	41 (89 %)	<0,001
Terminale NI [Jahre]	4,4 ± 4,4	3,7 ± 3,0	5,1 ± 5,3	0,123

RRsys vor Behandlung [mmHg]	132 ± 17	131 ± 18	132 ± 17	0,762
RRdia vor Behandlung [mmHg]	73 ± 12	73 ± 14	73 ± 9	0,989
RRmittl vor Behandlung [mmHg]	92 ± 12	92 ± 12	92 ± 12	0,855
RRsys nach Behandlung [mmHg]	124 ± 23	119 ± 23	128 ± 21	0,072
RRdia nach Behandlung [mmHg]	69 ± 12	67 ± 12	71 ± 12	0,176
RRmittl nach Behandlung [mmHg]	87 ± 14	85 ± 14	90 ± 13	0,078
Diabetes mellitus [ja]	48 (55 %)	25 (60 %)	23 (50 %)	0,399
Prävalentes CVE [ja]	32 (36 %)	19 (45 %)	13 (28 %)	0,123
CRP [mg/l]	11,1 ± 14,8	13,2 ± 17,6	9,0 ± 11,3	0,210
Phosphat [mg/dl]	5,4 ± 1,5	5,2 ± 1,3	5,5 ± 1,6	0,230
Gesamtcholesterin [mg/dl]	157,4 ± 43,2	148,2 ± 39,4	162,5 ± 44,8	0,229
Blutfluss [ml/min]	284 ± 52	298 ± 64	271 ± 34	0,016
Kt/V	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,3	0,811
Dialysedauer [min]	261 ± 30	252 ± 27	268 ± 31	0,019
Volumenentzug [l]	2,1 ± 1,4	2,2 ± 1,7	1,9 ± 1,1	0,433

Der Männeranteil war bei den Patienten mit HDF Behandlung signifikant höher als bei Patienten, die eine HD Behandlung erhielten. Das Alter der Patienten mit HDF Behandlung war um durchschnittlich 5 Jahre niedriger, was jedoch statistisch nicht signifikant war. Im Medizinischen Versorgungszentrum Saarpfalz wurden signifikant mehr Patienten mit HDF behandelt als im Universitätsklinikum des Saarlandes. So wurden 89 % aller eingeschlossenen Patienten, die mit HDF behandelt wurden, aus dem Medizinischen Versorgungszentrum Saarpfalz rekrutiert, während 83 % aller Patienten, die mit HD behandelt wurden, vom

Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert wurden. Die Patienten, die mit HDF behandelt wurden, waren tendenziell länger terminal niereninsuffizient als diejenigen Patienten, die mit HD behandelt wurden. Im Patientenkollektiv hatten 36 % ein prävalentes kardiovaskuläres Ereignis, darunter 45 % der Patienten unter HD Behandlung und 28 % der Patienten unter HDF Behandlung, was jedoch die statistische Signifikanz verfehlte. Der mittlere Blutfluss war bei Patienten mit HD Behandlung signifikant höher und die Behandlungsdauer signifikant kürzer als bei den Patienten mit HDF Behandlung.

Unter den 46 Patienten mit HDF Behandlung erhielten 76,1 % ihre Behandlung im Postdilutionsmodus und 23,9 % im Prädilutionsmodus. Bei 44 HDF Patienten konnte das Filtrationsvolumen erfasst werden; es lag im Mittel bei $2,4 \pm 1,0$ l. Das Substitutionsvolumen wurde bei 20 HDF Patienten erfasst und lag im Mittel bei $30,7 \pm 14,3$ l. Das Konvektionsvolumen, errechnet aus der Summe des Substitutionsvolumens und dem intradialytischen Volumenentzug, wurde bei 18 Patienten erfasst und belief sich im Mittel auf $31,4 \pm 12,3$ l.

4.2. Änderungsraten des Blutdrucks während der Nierenersatzbehandlung (HD, HDF)

Der Blutdruck der Patienten wurde jeweils vor und nach der HD bzw. HDF Behandlung gemessen. Während der HD Behandlung kam es zu einer signifikanten Absenkung des systolischen Blutdrucks und des mittleren Blutdrucks (Abbildung 1). Für die Patienten mit HDF Behandlung zeigte sich kein signifikanter Blutdruckabfall.

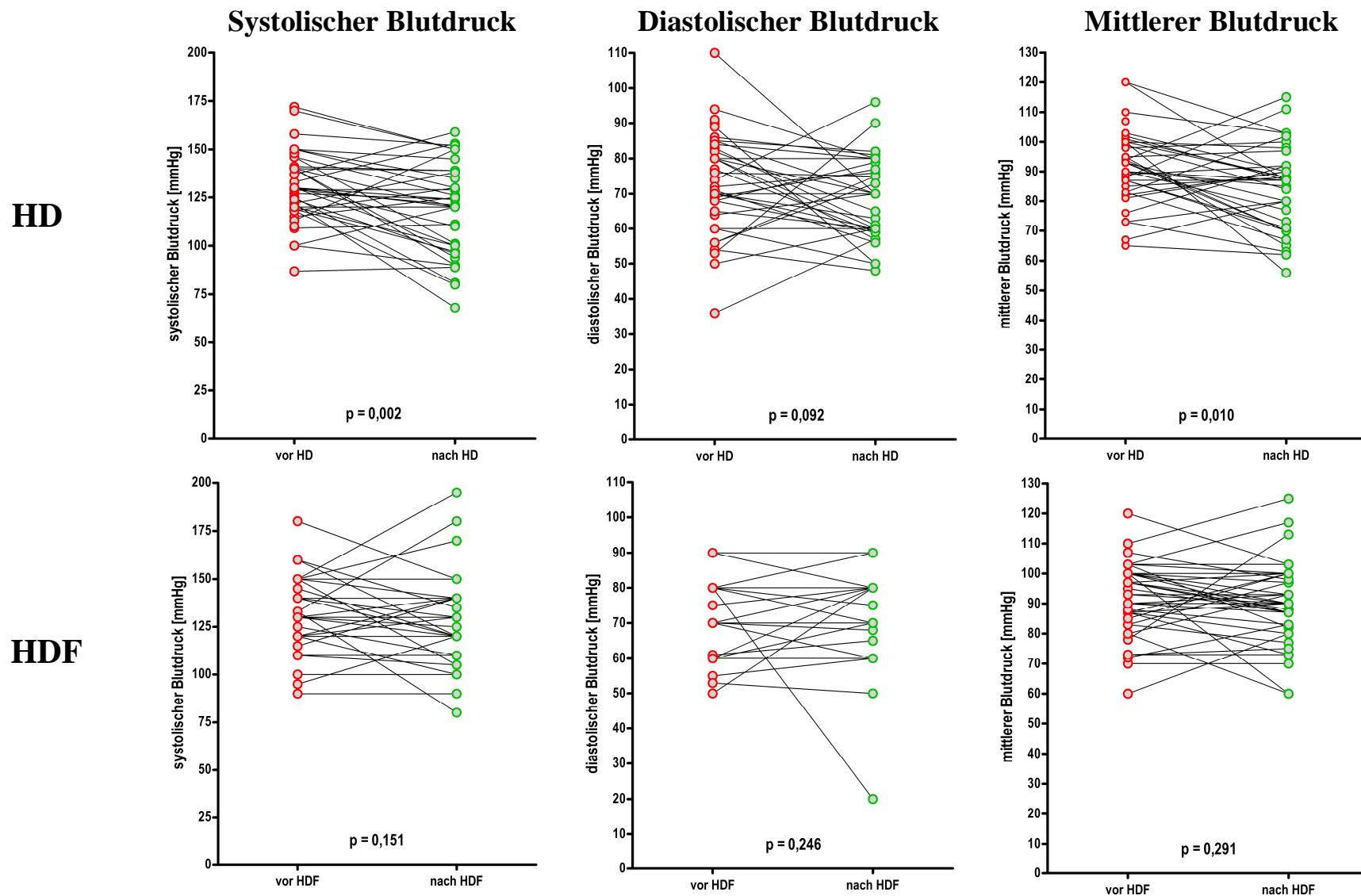


Abbildung 1: Änderung des Blutdrucks während der HDF und HD Behandlung. Die Blutdruckwerte der Patienten mit HD (oben) und mit HDF (unten) vor der Behandlung sind durch einem roten Kreis gekennzeichnet, während die Blutdruckwerte nach der Behandlung durch einen grünen Kreis gekennzeichnet sind. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines gepaarten t-Tests.

4.3 Charakterisierung der Monozytensubpopulationen

4.3.1 Monozytensubpopulationen in der Gesamtkohorte

Die Monozytensubpopulationen wurden in der gesamten Kohorte vor der Nierenersatzbehandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Da bei 10 Patienten kein Differentialblutbild zur Verfügung stand, konnten bei diesen Patienten keine absoluten Zellzahlen der Monozytensubpopulationen bestimmt werden. Deshalb fokussiert die nachfolgende Auswertung auf die prozentualen Werte der drei Monozytensubpopulationen.

So lag die Verteilung der Monozytensubpopulationen in der Gesamtkohorte bei 76,5 % für die klassischen (CD14++CD16-) Monozyten, 5,6 % für die intermediären (CD14++CD16+) Monozyten und 17,9 % für die nichtklassischen (CD14+CD16++) Monozyten. Bei den 78 Patienten mit vorhandenem Differentialblutbild errechneten sich die absoluten Zellzahlen auf 500 ± 282 klassische Monozyten/ μl , 37 ± 23 intermediäre Monozyten/ μl und 111 ± 57 nichtklassische Monozyten/ μl .

Interessanterweise zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem systolischen, diastolischen und mittleren Blutdruck und den Gesamtmonozyten (Tabelle 2). Betrachtet man die prozentuale Verteilung der Monozytensubpopulationen in der Gesamtkohorte, so korrelierte die Höhe des C-Reaktiven Proteins positiv mit dem Anteil der intermediären Monozyten sowie negativ mit dem Anteil der nichtklassischen Monozyten (Tabelle 2). Die Assoziation der Gesamtmonozyten mit dem diastolischen Blutdruck ($r=-0,239$; $p=0,035$) sowie der intermediären Monozyten mit dem C-reaktiven Protein ($r=0,326$; $p=0,005$) blieb auch bei Auswertung der absoluten Zahlen für die 78 Patienten bestehen.

Darüberhinaus zeigten Diabetiker eine Verschiebung der Monozytensubpopulationen, wobei Patienten mit Diabetes mellitus signifikant höhere Anteile der klassischen Monozyten und niedrigere Anteile der nicht-klassischen Monozyten aufwiesen (Tabelle 3). Diese Beobachtung zeigt sich auch bei der Auswertung der absoluten Zellzahlen: so hatten Diabetiker mit einer Zellzahl von 569 ± 335 Zellen/ μl signifikant höhere Werte als Nichtdiabetiker (414 ± 164 Zellen/ μl ; $p=0,014$). Des Weiteren hatten Raucher mit 81 ± 11 Zellen/ μl im Vergleich zu den Nichtrauchern (115 ± 59 Zellen/ μl) eine signifikant geringere Anzahl an nichtklassischen Monozyten ($p<0,001$), obwohl die prozentualen Anteile der Monozytensubpopulationen nicht differierten. Auch Patienten mit einem kardiovaskulären Ereignis in der Vorgeschichte wiesen signifikant höhere Zellzahlen (132 ± 60 Zellen/ μl) – nicht aber höhere prozentuale Anteile – der nichtklassischen Monozyten auf, als Patienten

ohne prävalentes kardiovaskuläres Ereignis (98 ± 51 Zellen/ μl ; $p=0,011$), ohne dass die prozentualen Anteile der Monozytensubpopulationen differierten.

Tabelle 2: Korrelationsanalyse der Monozytensubpopulationen (in %) der Gesamtkohorte mit den Baselinecharakteristika. BMI, RRsys, RRdia, RRmittl, CRP, Gesamtcholesterin wurden vor der Behandlung erhoben. Abkürzungen: BMI: Body Mass Index; CRP = C-reaktives Protein; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdia: diastolischer Blutdruck; RRmittl: mittlerer Blutdruck; NI = Niereninsuffizienz. Die Korrelation erfolgte nach Pearson. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten (r) und das Signifikanzniveau (p).

	Gesamtmonozyten		Klassische Monozyten		Intermediäre Monozyten		Nichtklassische Monozyten	
	(% aller Leukozyten)		(% aller Monozyten)		(% aller Monozyten)		(% aller Monozyten)	
	r	p	R	P	R	p	r	p
Alter	0,044	0,705	-0,026	0,813	0,143	0,183	-0,028	0,793
BMI [kg/m²]	-0,209	0,090	-0,100	0,392	-0,114	0,329	0,155	0,185
RRsys	-0,260	0,022	0,033	0,758	-0,152	0,158	0,023	0,829
RRdia	-0,296	0,008	0,016	0,883	0,003	0,975	-0,019	0,860
RRmittl	-0,294	0,009	0,001	0,991	-0,041	0,705	0,015	0,890
CRP [mg/l]	-0,023	0,848	0,114	0,309	0,256	0,021	-0,228	0,040
Gesamtcholesterin	0,263	0,065	-0,093	0,484	0,057	0,670	0,081	0,541

Terminale NI [Jahre]	0,019	0,869	-0,041	0,709	0,013	0,904	0,041	0,709
Blutfluss [ml/min]	0,000	0,999	-0,165	0,125	0,046	0,671	0,165	0,124
Dialysedauer [min]	0,074	0,527	-0,018	0,867	-0,137	0,209	0,075	0,494

Tabelle 3: Assoziation der Monozytensubpopulationen (in %) mit Geschlecht, Diabetes mellitus, Raucherstatus, und prävalenten kardiovaskulären Ereignissen (CVE). Alle Werte wurden vor der Behandlung erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

	Gesamtmonozyten (% aller Leukozyten)	Klassische Monozyten (% aller Monozyten)	Intermediäre Monozyten (% aller Monozyten)	Nichtklassische Monozyten (% aller Monozyten)
Geschlecht				
Männlich	9,1 ± 2,1	76,6 ± 7,5	5,4 ± 2,1	18,0 ± 6,9
weiblich	8,7 ± 4,1	76,1 ± 6,9	6,1 ± 3,4	17,8 ± 5,6
p	0,677	0,727	0,325	0,939
Diabetes mellitus				
nein	9,3 ± 3,6	73,8 ± 7,2	6,1 ± 3,1	20,1 ± 6,8
ja	8,6 ± 2,3	78,7 ± 6,6	5,2 ± 2,0	16,1 ± 5,8
p	0,293	0,001	0,133	0,004
Raucher				
nein	9,0 ± 3,0	76,0 ± 7,4	5,8 ± 2,6	18,2 ± 6,7

ja	8,8 ± 2,1	79,3 ± 5,5	4,4 ± 1,7	16,3 ± 5,8
p	0,832	0,254	0,164	0,473
Prävalentes CVE				
nein	9,2 ± 3,2	76,9 ± 7,3	5,7 ± 3,1	17,4 ± 6,2
ja	8,6 ± 2,4	75,8 ± 7,3	5,4 ± 1,5	18,8 ± 7,0
p	0,363	0,508	0,531	0,343

4.3.2 Monozytensubpopulationen und Nierenersatzverfahren

Anschließend wurde untersucht, ob sich Patienten in Abhängigkeit vom Nierenersatzverfahren (HD oder HDF) in der Verteilung der Monozytensubpopulationen unterscheiden, um den langfristigen Einfluss der Nierenersatztherapie auf die Monozytensubpopulationen zu erfassen. Dazu wurden die Monozytensubpopulationen vor der jeweiligen Behandlung bestimmt. Um eine Aussage über den Einfluss der Nierenersatzverfahrens auf die Monozytensubpopulationen zu treffen, wurde zusätzlich eine durchflusszytometrische Analyse der Monozyten nach der jeweiligen Behandlung durchgeführt. Diese durchflusszytometrische Analyse erfolgte aus organisatorischen Gründen bei lediglich einem Teil der Kohorte (n = 55). In dieser Gruppe befanden sich 29 Patienten mit HD und 26 Patienten mit HDF.

Zwischen der HD und HDF Behandlung zeigte sich hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Monozytensubpopulationen weder vor noch nach der Behandlung ein signifikanter Unterschied (Abbildung 2). Nach der Behandlung sank zwar der Anteil der intermediären und nichtklassischen Monozyten, die Reduktion war jedoch bei beiden Nierenersatzverfahren vergleichbar. Ebenso war kein signifikanter Unterschied in dem Anteil der Gesamtmonozyten vor noch nach Behandlung bezüglich beider Verfahren zu erkennen.

Bei denjenigen Patienten, bei denen die absoluten Monozytenzahlen bestimmt werden konnten (bei 78 Patienten vor Behandlung und 51 Patienten nach Behandlung), zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Nierenersatzverfahren bezüglich der Gesamtmonozyten und der drei Monozytensubpopulationen (Gesamtmonozyten vor HD: 609 ± 287 Zellen/ μ l; Gesamtmonozyten vor HDF: 688 ± 341 Zellen/ μ l; $p=0,273$. Klassische Monozyten vor HD: 465 ± 245 Zellen/ μ l, klassische Monozyten vor HDF: 538 ± 317 Zellen/ μ l; $p=0,261$. Intermediäre Monozyten vor HD: 35 ± 20 Zellen/ μ l; intermediäre Monozyten vor HDF: 38 ± 25 Zellen/ μ l; $p=0,603$. Nichtklassische Monozyten vor HD: 109 ± 58 Zellen/ μ l; nichtklassische Monozyten vor HDF: 113 ± 56 Zellen/ μ l; $p=0,774$. Gesamtmonozyten nach HD: 586 ± 328 Zellen/ μ l; Gesamtmonozyten nach HDF: 575 ± 240 Zellen/ μ l; $p=0,866$. Klassische Monozyten nach HD: 510 ± 342 Zellen/ μ l; Klassische Monozyten nach HDF: 487 ± 229 Zellen/ μ l; $p=0,782$. Intermediäre Monozyten nach HD: 30 ± 31 Zellen/ μ l; Intermediäre Monozyten nach HDF: 30 ± 42 Zellen/ μ l; $p=0,979$. Nichtklassische Monozyten nach HD: 88 ± 46 Zellen/ μ l; nichtklassische Monozyten nach HDF: 88 ± 56 Zellen/ μ l, $p=0,953$).

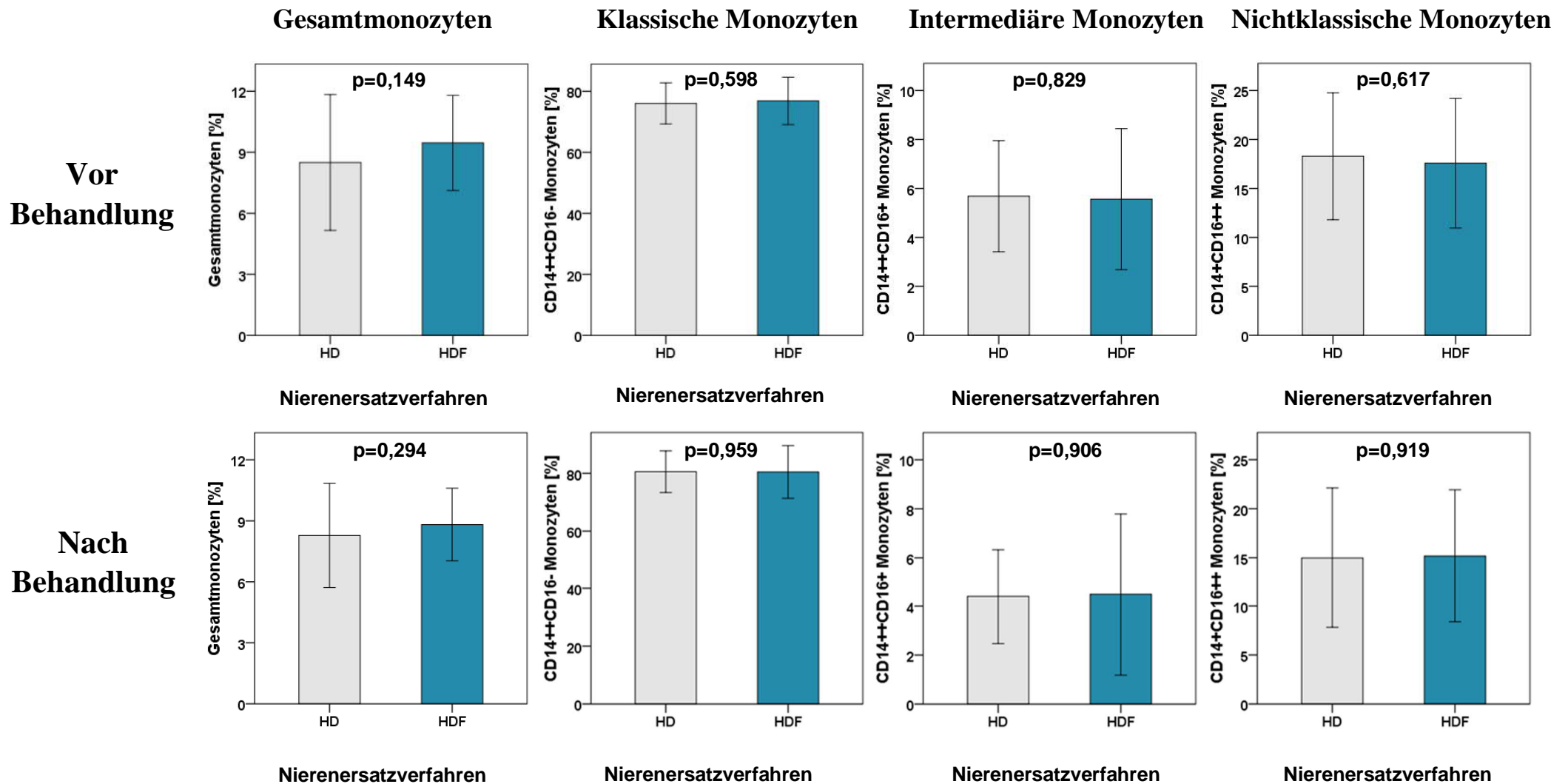


Abbildung 2: Monozytensubpopulationen und Nierenersatzverfahren. Dargestellt ist das Nierenersatzverfahren (HD: grau, HDF: blau) auf der x-Achse und der prozentualen Anteil der Gesamtmonozyten an den Leukozyten, sowie der prozentualen Anteil der Monozytensubpopulationen (Mittelwert + Standardabweichung) an den Gesamtmonozyten auf der y-Achse. Die obere Reihe zeigt die Werte vor der Behandlung, während die untere Reihe die Werte nach der Behandlung aufzeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

4.4 Charakterisierung des C1 Metabolismus in der HD/HDF Studie

4.4.1 Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin in der Gesamtkohorte

Die Bestimmung der C1 Metaboliten (Homocystein, S-Adenosylhomocystein und S-Adenosylmethionin) erfolgte in der gesamten Kohorte. Im Mittel lagen die Plasma Homocysteinspiegel bei $32,6 \pm 14,7 \mu\text{M}$, die Plasma SAH Spiegel bei $411,0 \pm 156,3 \text{ nM}$ und die Plasma SAM Spiegel bei $436,9 \pm 148,6 \text{ nM}$ vor der Nierenersatzbehandlung.

In der Gesamtkohorte zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Höhe der Plasma Homocysteinspiegel und der Plasma SAH Spiegel vor der Nierenersatzbehandlung mit dem Alter der Patienten (Tabelle 4). Außerdem bestand eine negative Korrelation zwischen der Höhe der Plasma SAM Spiegel und der Höhe des diastolischen und mittleren Blutdrucks vor der Behandlung. Darüber hinaus korrelierten die Plasma SAM Spiegel negativ mit dem Gesamtcholesterin und die Plasma Homocysteinspiegel negativ mit dem CRP. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Plasma SAH Spiegel und der Dauer der terminalen Niereninsuffizienz sowie dem Blutfluss.

Darüber hinaus bestanden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Geschlecht der Patienten, dem Vorhandensein eines Diabetes mellitus, dem Nikotinabusus, einem stattgehabten kardiovaskulären Ereignis und der Höhe der Plasma Homocystein-, SAH- und SAM Spiegel (Tabelle 5).

Tabelle 4: Korrelation von Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin mit den Baselinecharakteristika. BMI, RRsys, RRdia, RRmittl, CRP, Gesamtcholesterin wurden vor der Behandlung erhoben. Abkürzungen: BMI: Body Mass Index; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdia: diastolischer Blutdruck; RRmittl: mittlerer Blutdruck; CRP: C-reaktives Protein; NI: Niereninsuffizienz. Die Korrelation erfolgte nach Pearson. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten (r) und das Signifikanzniveau (p).

	Homocystein [μM]		S-Adenosylhomocystein [nM]		S-Adenosylmethionin [nM]	
	r	P	r	p	r	p
Alter [Jahre]	-0,287	0,007	-0,391	<0,001	-0,170	0,113
BMI [kg/m^2]	0,041	0,730	-0,041	0,726	0,217	0,062
RRsys [mmHg]	0,012	0,915	-0,077	0,473	-0,185	0,085
RRdia [mmHg]	0,109	0,313	0,056	0,607	-0,289	0,006
RRmittl [mmHg]	0,100	0,354	0,019	0,859	-0,265	0,013
CRP [mg/l]	-0,247	0,026	-0,042	0,709	0,121	0,281
Gesamtcholesterin [mg/dl]	0,217	0,098	-0,028	0,832	-0,282	0,030
Terminale NI [Jahre]	0,037	0,736	0,229	0,033	0,066	0,541

Blutfluss [ml/min]	0,090	0,402	0,000	0,999	-0,006	0,959
Dialysedauer [min]	0,005	0,965	0,314	0,003	0,119	0,276

Tabelle 5: Assoziation der C1 Metaboliten (Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin) mit Geschlecht, Diabetes mellitus, Nikotin und prävalenten kardiovaskulären Ereignissen. Die Werte wurden vor der Behandlung erhoben. Abkürzung: CVE: kardiovaskuläres Ereignis. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

	Homocystein [μM]	S-Adenosylhomocystein [nM]	S-Adenosylmethionin [nM]
Geschlecht			
männlich	32,6 \pm 14,2	417,3 \pm 155,1	439,9 \pm 161,4
weiblich	32,6 \pm 16,0	396,9 \pm 160,8	430,3 \pm 117,3
p	0,991	0,574	0,776
Diabetes mellitus			
nein	32,1 \pm 11,2	419,7 \pm 159,3	406,6 \pm 88,0
ja	33,0 \pm 17,2	403,82 \pm 155,0	462,1 \pm 181,7
p	0,768	0,638	0,065
Raucher			
nein	32,7 \pm 15,2	409,3 \pm 155,8	435,5 \pm 150,7
ja	29,9 \pm 11,9	456,5 \pm 185,1	487,7 \pm 140,8

p	0,638	0,451	0,380
Prävalentes CVE			
nein	33,2 ± 14,5	423,7 ± 155,4	428,0 ± 138,8
ja	31,6 ± 15,2	388,8 ± 157,7	452,4 ± 165,6
p	0,632	0,316	0,463

4.4.2 Homocystein, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin und Nierenersatzverfahren

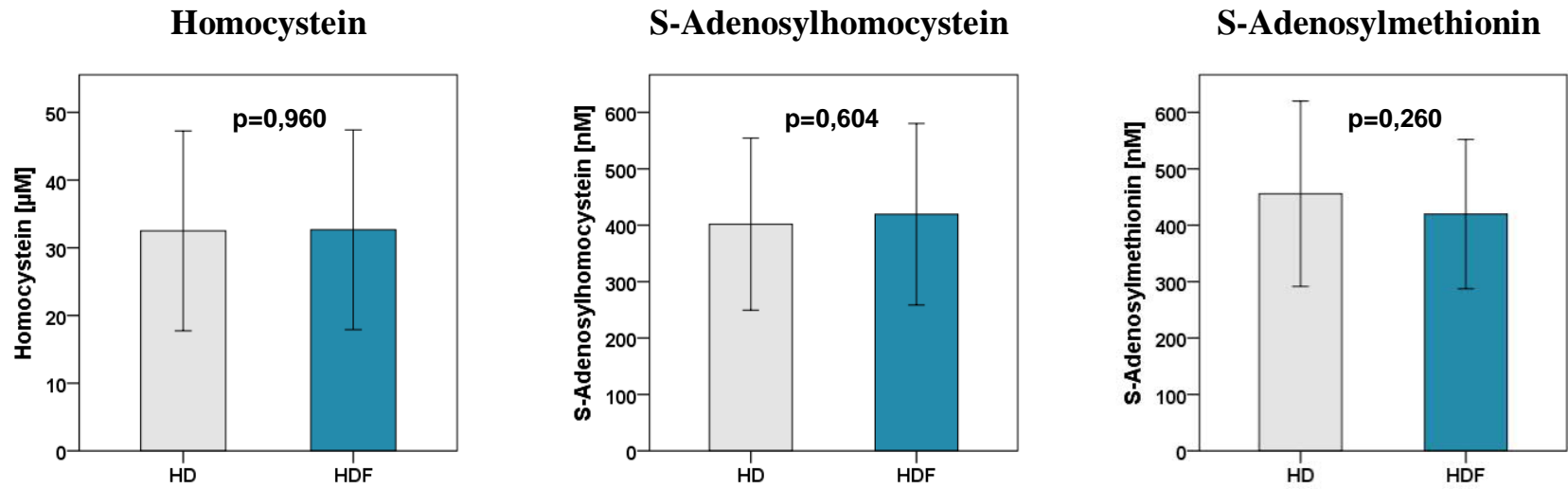
Um den langfristigen Einfluss der beiden Nierenersatzverfahren auf die C1 Metaboliten zu beurteilen, wurden Homocystein, SAH und SAM bei allen Patienten vor der Behandlung bestimmt (Abbildung 3).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine einzelne HDF Behandlung eine stärkere Elimination der C1 Metaboliten erlaubt. Dazu wurden zusätzlich bei allen Patienten Homocystein, SAH und SAM jeweils nach einer Behandlung bestimmt (Abbildung 3).

Zwischen der HD und HDF Behandlung konnte hinsichtlich der Plasmaspiegel von Homocystein, SAH und SAM vor und nach der Behandlung kein signifikanter Unterschied herausgestellt werden (Abbildung 3).

Betrachtet man hingegen die Eliminationsraten der einzelnen C1 Metaboliten durch die beiden Nierenersatzverfahren, so zeigt sich, dass die HDF Behandlung im Hinblick auf die Elimination der SAH Plasmaspiegel signifikant effektiver war (Abbildung 4). Während es bei der HD Behandlung zu einer Reduktion der SAH Plasmaspiegel um $76,8 \pm 8,8 \%$ kam, lag die Reduktionsrate durch die HDF Behandlung bei $81,3 \pm 8,2 \%$ ($p=0,016$). Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Elimination von Homocystein und SAM, wobei hier knapp die statistische Signifikanz verfehlt wurde (Homocystein: HD: $43,8 \pm 10,4 \%$; HDF: $48,1 \pm 10,3 \%$; $p=0,053$; SAM: HD: $70,2 \pm 8,7 \%$; HDF: $72,5 \pm 9,0 \%$; $p=0,233$).

**Vor
Behandlung**



**Nach
Behandlung**

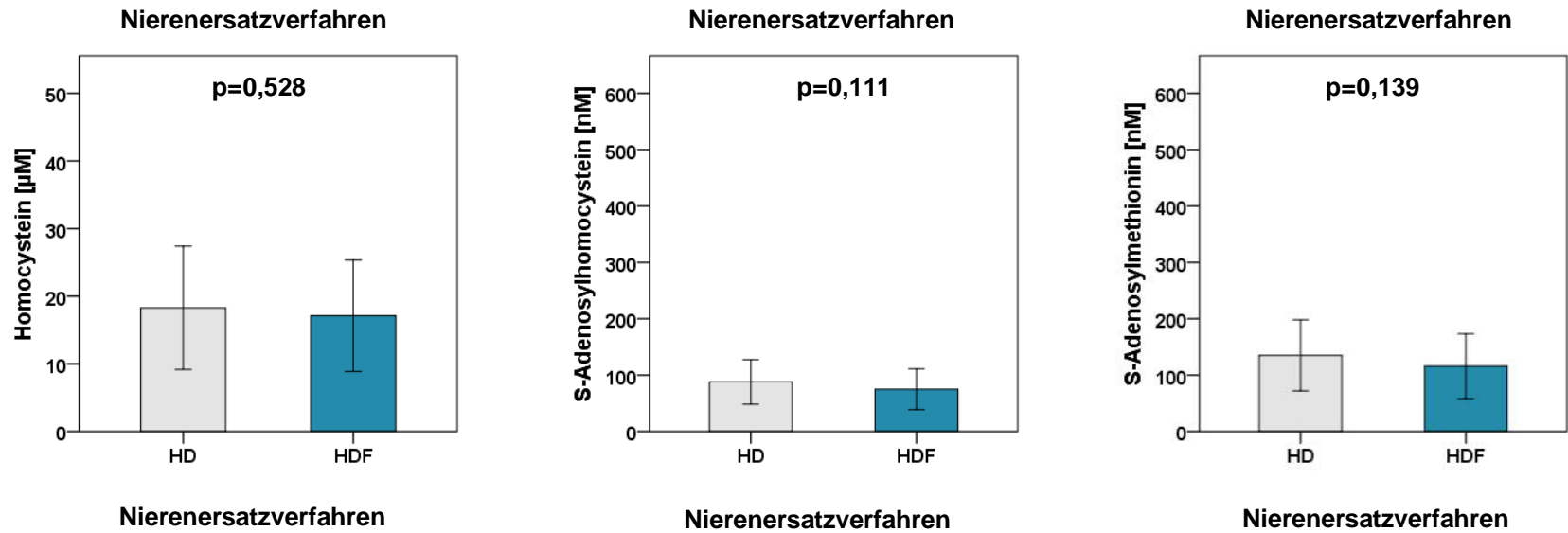


Abbildung 3: C1 Metaboliten und Nierenersatzverfahren. Dargestellt ist das Nierenersatzverfahren (HD: grau, HDF: blau) auf der x-Achse sowie die die Höhe der Plasma Homocystein-, S-Adenosylhomocystein- und S-Adenosylmethioninspiegel auf der y-Achse (Mittelwert \pm

Standardabweichung). In der oberen Reihe sind die Werte für Homocystein, SAH und SAM vor der Behandlung dargestellt, während die untere Reihe die Werte nach der Behandlung zeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

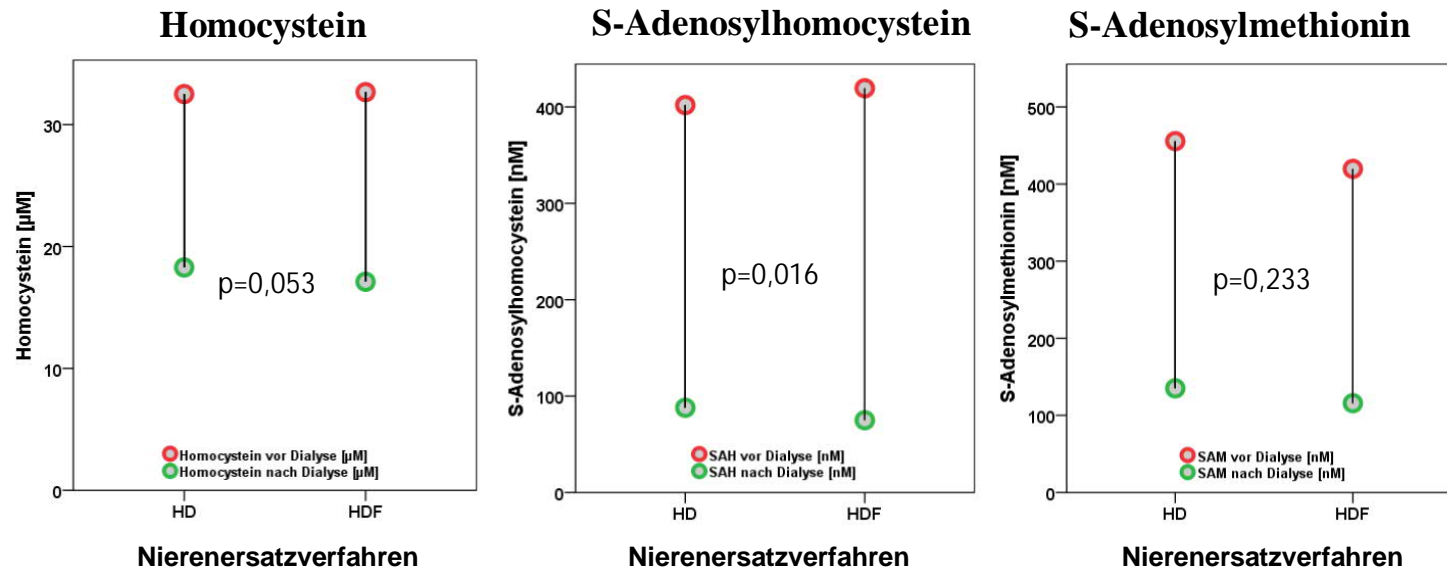


Abbildung 4: Reduktionsraten der C1 Metaboliten durch die beiden Nierenersatzverfahren. Auf der x-Achse wird zwischen den zwei Dialyseverfahren HD und HDF unterschieden. Die y-Achse zeigt die Höhe des jeweiligen Plasma C1 Metabolitenwertes. Der rote Kreis stellt die Mittelwerte der jeweiligen C1 Metaboliten vor der Behandlung dar, während der grüne Kreis die jeweiligen Mittelwerte nach der Behandlung aufzeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem gepaarten t-Test.

4.5 Assoziation spezifischer Parameter der HDF Behandlung mit Monozytensubpopulationen und C1 Metaboliten

4.5.1 Unterschiede zwischen Prä- und Postdilutionsmodus

Von den 46 Patienten mit HDF-Behandlung erhielten 35 Patienten ihre Behandlung im Postdilutionsmodus, während die restlichen 11 Patienten ihre Behandlung im Prädilutionsmodus erhielten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Baselinecharakteristika der Patienten mit HDF Behandlung. Abkürzungen: BMI: Body Mass Index; NI: Niereninsuffizienz; CVE: kardiovaskuläres Ereignis; CRP: C-reaktives Protein; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdia: diastolischer Blutdruck; RRmittl: mittlerer Blutdruck; Kt/V: Parameter zur Bestimmung der Dialyseeffektivität (K: Harnstoffclearance, t: Dialysezeit, V: 60% des Körpergewichts). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test bzw. dem χ^2 Test.

	Prädilution (n=11)	Postdilution (n=35)	p
Alter [Jahre]	70 ± 19	64 ± 15	0,307
Geschlecht [m]	10 (91%)	27 (77%)	0,421
BMI [kg/m²]	26 ± 4	26 ± 6	0,826
Raucher [ja]	0 (0 %)	4 (11%)	0,558
Dialysezentrum [Medizinisches Versorgungszentrum Saarpfalz]	11 (100%)	30 (86%)	0,317
Terminale NI [Jahre]	5,4 ± 5,5	5,1 ± 5,3	0,885
RRsys vor Behandlung [mmHg]	134 ± 14	132 ± 18	0,701
RRdia vor Behandlung [mmHg]	74 ± 7	73 ± 10	0,804
RRmittl vor Behandlung [mmHg]	94 ± 8	91 ± 13	0,564

RRsys nach Behandlung [mmHg]	131 ± 12	127 ± 24	0,621
RRdia nach Behandlung [mmHg]	73 ± 8	70 ± 13	0,553
RRmittl nach Behandlung [mmHg]	85 ± 14	90 ± 13	0,078
Diabetes mellitus [ja]	4 (36%)	19 (54%)	0,491
Prävalentes CVE [ja]	3 (27%)	10 (29%)	0,123
CRP [mg/l]	9,0 ± 8,2	9,0 ± 12,2	0,998
Phosphat [mg/dl]	5,7 ± 1,3	5,5 ± 1,8	0,750
Gesamtcholesterin [mg/dl]	150,9 ± 38,6	166,6 ± 46,8	0,350
Blutfluss [ml/min]	255 ± 38	276 ± 31	0,072
Kt/V	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,714
Dialysedauer [min]	281 ± 24	264 ± 32	0,106
Volumenentzug [l]	2,2 ± 0,6	1,9 ± 1,2	0,322

Im Hinblick auf kardiovaskuläre Risikofaktoren (Alter, BMI, Dauer der terminalen Niereninsuffizienz, Blutdrücke vor und nach Behandlung, CRP, Phosphat) und Maße für die Behandlungseffizienz (Blutfluss, Kt/V, Dialysedauer, Volumenentzug) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei HDF Modalitäten.

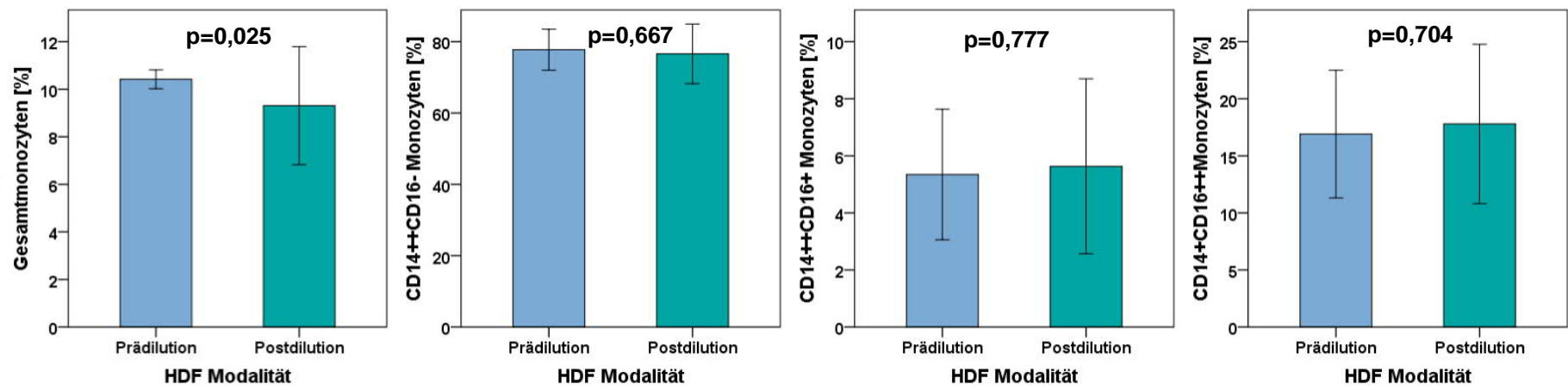
Bezüglich der Verteilung der Monozytensubpopulationen unterschieden sich die Patienten mit Behandlung im Prädilutionsmodus ebenso nicht signifikant von den Patienten mit Behandlung im Postdilutionsmodus (Abbildung 5). Die Patienten im Postdilutionsmodus wiesen jedoch im Vergleich zu den Patienten im Prädilutionsmodus mit einem signifikant geringeren Prozentsatz an Gesamtmonozyten auf ($p=0,025$) (Abbildung 5).

Bei 5 Patienten im Prädilutionsmodus und bei 32 Patienten im Postdilutionsmodus wurden die absoluten Werte der Monozytensubpopulationen bestimmt. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich Prä- oder Postdilution. Bei 7 Patienten im Prädilutionsmodus und bei

17 Patienten im Postdilutionsmodus wurden die Monozytensubpopulationen auch nach der Nierenersatzbehandlung bestimmt. Sie unterschieden sich jedoch weder prozentual noch absolut signifikant zwischen den beiden Modalitäten.

Ebenso zeigte sich zwischen Prä- und Postdilutionsmodus kein Unterschied in der Höhe der C1 Metaboliten (Abbildung 6). Auch die Eliminationsraten der C1 Metaboliten unterschieden sich nicht signifikant im Hinblick auf die beiden HDF Modalitäten (Homocystein: $45,7 \pm 7,7$ % (Prädilution) versus $48,8 \pm 10,9$ % (Postdilution), $p=0,380$; SAH: $79,7 \pm 6,6$ % (Prädilution) versus $81,7 \pm 8,7$ % (Postdilution), $p=0,476$; SAM: $73,4 \pm 5,5$ % (Prädilution) versus $72,2 \pm 9,8$ % (Postdilution), $p=0,708$).

Vor
Behandlung



Nach
Behandlung

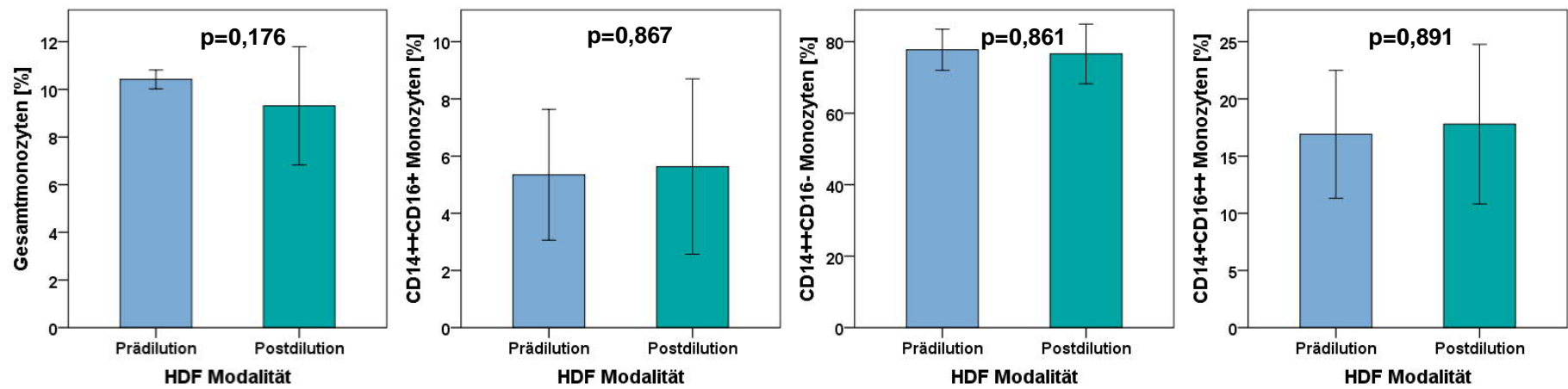
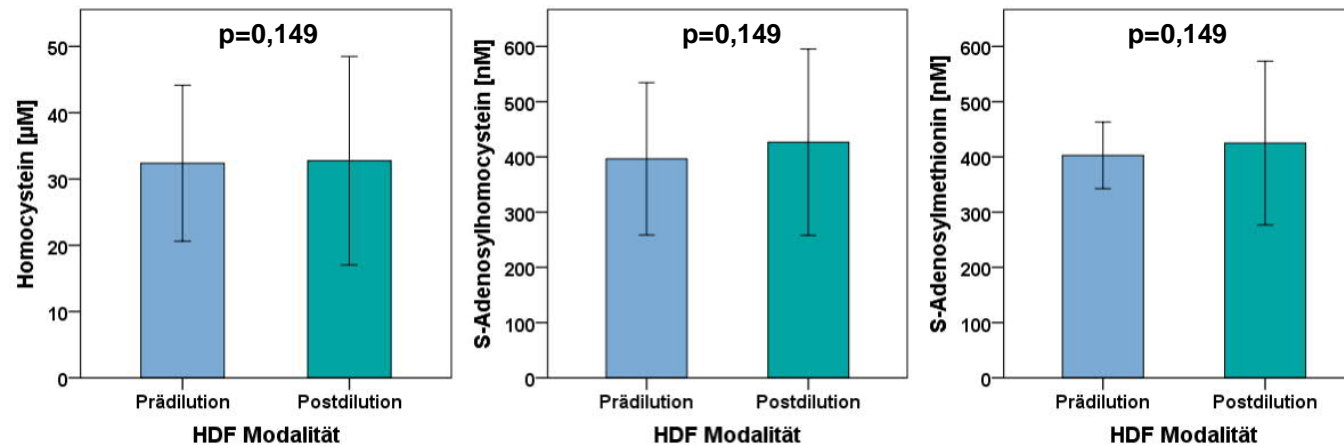


Abbildung 5: Monozytenheterogenität und HDF Modalität. Dargestellt ist die HDF Modalität, Prädilution links in hellblau und Postdilution rechts in türkis auf der x-Achse bezogen auf den prozentualen Anteil der Gesamtmonozyten (in % aller Leukozyten) und den prozentualen Anteil

der klassischen, intermediären und nichtklassischen Monozyten (in % aller Monozyten) (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf der y-Achse. Die obere Reihe zeigt die Werte vor der Behandlung und die untere Reihe die Werte nach Behandlung. Die Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

**Vor
Behandlung**



**Nach
Behandlung**

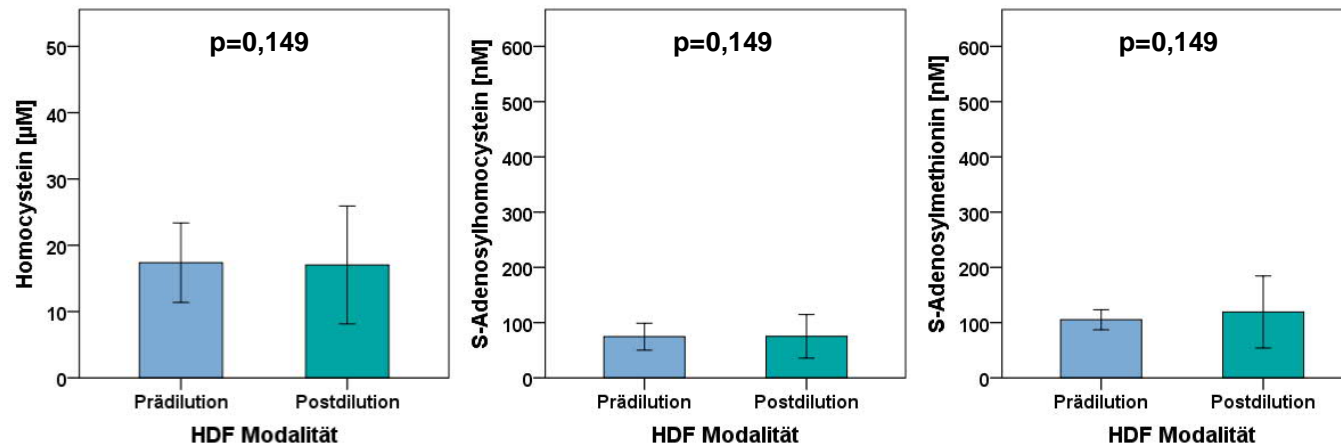


Abbildung 6: C1 Metaboliten und HDF Modalität. Dargestellt ist die HDF Modalität (Prädilution links in hellblau und Postdilution rechts in türkis) auf der x-Achse. Die y-Achse zeigt die Höhe der C1 Metaboliten Homocystein, S-Adenosylhomocystein und S-Adenosylmethionin (Mittelwert \pm Standardabweichung) vor der Behandlung (obere Reihe) und nach der Behandlung (untere Reihe). Die Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

4.5.2 Konvektionsvolumen, Filtrationsvolumen und Substitutionsvolumen

Bei 18 Patienten mit HDF-Behandlung wurde das Konvektionsvolumen bestimmt. Es betrug im Mittel $31,4 \pm 12,3$ l. Das Substitutionsvolumen lag im Mittel bei $30,7 \pm 14,3$ l (n=20). Das Filtrationsvolumen wurde bei 44 Patienten erhoben und betrug im Mittel $2,4 \pm 1,0$ l. Weder die Höhe des Konvektionsvolumens, des Filtrationsvolumens noch des Substitutionsvolumens korrelierte mit der Verteilung der Monozytensubpopulationen vor oder nach Behandlung oder mit den Plasmaspiegeln der C1 Metaboliten. Auch für kardiovaskuläre Risikofaktoren, Blutdruckunterschiede oder die Behandlungseffizienz konnten keine signifikanten Korrelationen gezeigt werden.

4.6 Längsschnittanalyse

4.6.1 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit kardiovaskulären Risikofaktoren und dialysespezifischen Faktoren

Insgesamt trat bei 22 Patienten der Gesamtkohorte (25 %) ein kardiovaskuläres Ereignis oder Todesfall (primärer Endpunkt) im Follow Up auf. Darunter waren 10 Patienten, die mit HD und 12 Patienten, die mit HDF behandelt wurden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug $1,2 \pm 0,4$ Jahre. In der folgenden Tabelle sind die Charakteristika der Kohorte, stratifiziert nach kardiovaskulärem Ereignis im Follow Up, dargestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: HD/HDF Kohorte stratifiziert nach kardiovaskulären Ereignissen im Follow Up. Abkürzungen: BMI: Body Mass Index; NI: Niereninsuffizienz; CVE: kardiovaskuläres Ereignis; CRP: C-reaktives Protein; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdia: diastolischer Blutdruck; RRmittl: mittlerer Blutdruck; Kt/V: Parameter zur Bestimmung der Dialyseeffektivität (K: Harnstoffclearance, t: Dialysezeit, V: 60 % der Körpermasse in der das Blut zirkulieren kann (Körperwassergehalt) Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test bzw. dem χ^2 Test.

	Kein CVE	CVE	p
	(n=66)	(n=22)	
Alter [Jahre]	65 ± 15	76 ± 12	0,003
Geschlecht [m]	43 (65 %)	18 (82 %)	0,186
BMI [kg/m²]	28 ± 6	26 ± 4	0,268
Raucher [ja]	6 (9 %)	1 (5 %)	0,671
Dialysezentrum [Medizinisches Versorgungszentrum Saarpfalz]	37 (56 %)	11 (50 %)	0,631
Dialyseverfahren [HD]	32 (49 %)	10 (46 %)	1,000
Terminale NI [Jahre]	4,5 ± 4,8	4,2 ± 2,9	0,763
RRsys vor Behandlung [mmHg]	132 ± 18	130 ± 18	0,598
RRdia vor Behandlung [mmHg]	74 ± 11	71 ± 12	0,269
RRmittl vor Behandlung [mmHg]	94 ± 11	89 ± 14	0,108
RRsys nach Behandlung [mmHg]	125 ± 25	122 ± 15	0,587
RRdia [mmHg] nach Behandlung	69 ± 13	70 ± 9	0,852
RRmittl nach Behandlung [mmHg]	88 ± 15	87 ± 9	0,848

Diabetes mellitus [ja]	33 (50 %)	15 (68 %)	0,216
Prävalentes CVE [ja]	21 (32 %)	11 (50 %)	0,135
CRP [mg/l]	9,9 ± 14,2	14,1 ± 16,3	0,268
Phosphat [mg/dl]	5,4 ± 1,5	5,2 ± 1,3	0,644
Gesamtcholesterin [mg/dl]	163,4 ± 40,4	138,1 ± 47,6	0,055
Blutfluss [ml/min]	285 ± 47	280 ± 67	0,728
Kt/V	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,5	0,962
Dialysedauer [min]	261 ± 32	259 ± 26	0,716
Volumenentzug [l]	2,0 ± 1,4	2,2 ± 1,3	0,672

Patienten, die den primären Endpunkt erreichten, waren älter. Weiterhin hatten sie tendenziell einen geringeren mittleren Blutdruck vor Beginn der Nierenersatzbehandlung, mehr prävalente kardiovaskuläre Ereignisse und niedrigeres Gesamtcholesterin als Patienten, die den Endpunkt nicht erreichten.

4.6.2 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit der Verteilung von Monozytensubpopulationen

Nachfolgend wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Verteilung der Monozytensubpopulationen vor der Behandlung und dem Auftreten des primären Endpunktes besteht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Kardiovaskuläres Outcome und Monozytensubpopulationen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Monozytenwerte vor Nierenersatzbehandlung in der Kohorte, stratifiziert nach kardiovaskulären Ereignissen im Follow Up. Gesamtmonozyten bezeichnen den prozentualen Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl (bestimmt aus dem Differentialblutbild). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

CVE	Gesamt- monozyten (%aller Leukozyten)	Klassische Monozyten (%aller Monozyten)	Intermediäre Monozyten (%aller Monozyten)	Nichtklassische Monozyten (%aller Monozyten)
Nein	8,8 \pm 3,1 (n=59)	75,9 \pm 7,4 (n=66)	5,6 \pm 2,8 (n=66)	18,5 \pm 6,4 (n=66)
Ja	9,5 \pm 2,4 (n=19)	78,1 \pm 6,9 (n=22)	5,6 \pm 1,9 (n=22)	16,3 \pm 6,9 (n=22)
p	0,344	0,228	0,958	0,173

Tendenziell wiesen Patienten, die den primären Endpunkt erreichten, einen höheren Anteil an klassischen Monozyten und einen niedrigeren Anteil an nichtklassischen Monozyten vor Behandlung auf, was jedoch nicht signifikant war. Die Werte für die intermediären Monozyten waren für beide Gruppen nahezu identisch.

Die absoluten Zellzahlen der Gesamtmonozyten betragen bei den Patienten ohne kardiovaskuläres Ereignis im Follow Up 635 \pm 317 Zellen/ μ l (n= 59) im Vergleich zu 684 \pm 310 Zellen/ μ l (n=19) bei den Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis im Follow Up (p=0,554). Die Zellzahlen der klassischen Monozyten (kein CVE (n=59): 485 \pm 281 Zellen/ μ l; CVE (n=19): 546 \pm 286 Zellen/ μ l; p=0,416), der intermediären Monozyten (kein

CVE (n=59): 36 ± 23 Zellen/ μ l; CVE (n=19): 39 ± 22 Zellen/ μ l; $p=0,617$) und der nichtklassischen Monozyten (kein CVE (n=59): 114 ± 59 Zellen/ μ l; CVE (n=19): 100 ± 47 ; $p=0,334$) unterschieden sich nicht signifikant.

4.6.3 Assoziation kardiovaskulärer Ereignisse im Follow Up mit Plasmaspiegeln der C1 Metaboliten

Abschließend wurde untersucht, ob die prädialytischen Serumplasmaspiegel und die relative intradialytische Elimination der C1 Metaboliten mit dem Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses im Follow Up assoziiert sind (Tabelle 9, Abbildung 7).

Tabelle 9: Kardiovaskuläres Outcome und Homocystein, SAH, SAM Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Plasma Homocystein-, S-Adenosylhomocystein- und S-Adenosylmethioninspiegel vor Nierenersatzbehandlung in der Kohorte, stratifiziert nach kardiovaskulären Ereignissen im Follow Up. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test.

CVE	Homocystein [nM]	S-Adenosyl- homocystein [μ M]	S-Adenosyl- methionin [μ M]
Nein (n=66)	$33,7 \pm 15,7$	$420,3 \pm 164,0$	$422,0 \pm 137,2$
Ja (n =22)	$29,2 \pm 10,7$	$383,3 \pm 130,0$	$481,5 \pm 175,0$
p	0,210	0,339	0,104

Tendenziell hatten Patienten, die den primären Endpunkt erreichten, sowohl niedrigere Homocystein- als auch SAH Plasmaspiegel, sowie höhere SAM Plasmaspiegel. Die statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht.

Betrachtet man jedoch die Reduktionsraten der C1 Metaboliten im Hinblick auf das Erreichen des primären Endpunktes, so zeigte sich, dass diejenigen Patienten, die den Endpunkt erreichten, eine tendenziell geringere Reduktionsrate der SAH Plasmaspiegel der Homocystein Plasmaspiegel und der SAM Plasmaspiegel hatten (Abbildung 7).

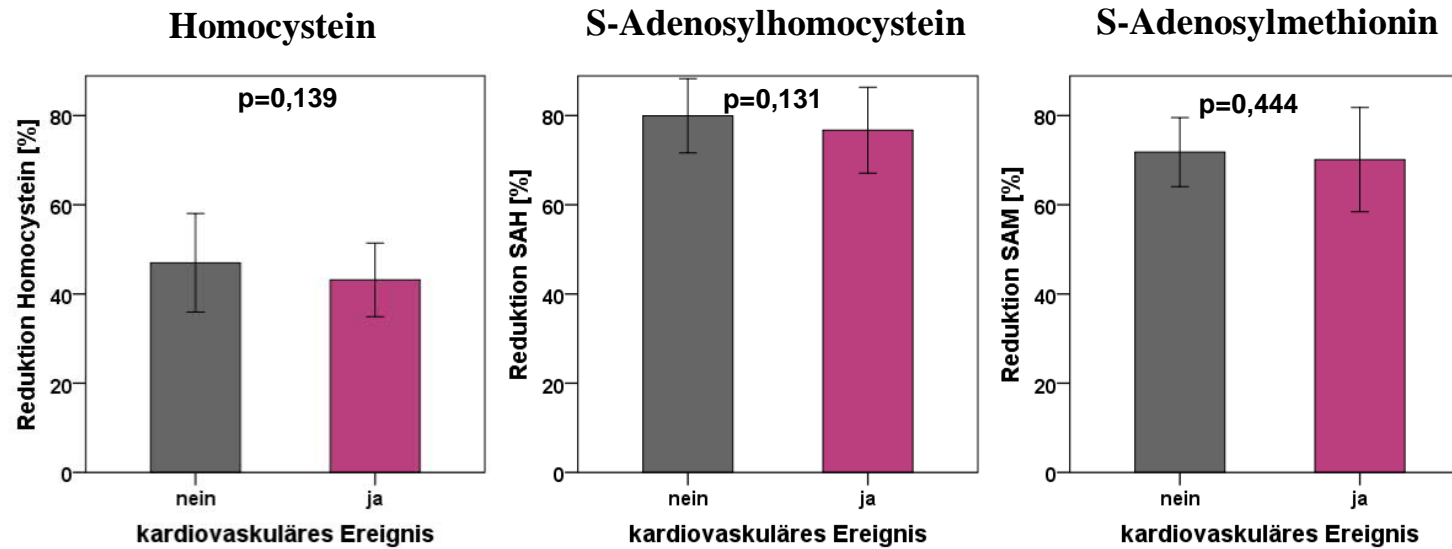


Abbildung 7: Kardiovaskuläres Outcome und Reduktionsraten der C1 Metaboliten durch die HD und HDF Behandlung. Die x-Achse zeigt, ob ein kardiovaskuläres Ereignis stattgefunden hat (nein in grau und ja in violett). Die y-Achse zeigt die prozentuale Reduktion von Homocystein, SAH und SAM (Mittelwert \pm Standardabweichung). Abkürzungen. SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

5. Diskussion

5.1 Einleitung

Chronisch nierenkranke Patienten haben aufgrund ihrer beschleunigten Atherogenese ein hohes Risiko, kardiovaskuläre Ereignisse zu erleiden [26]. Es ist daher von großem Interesse, Mechanismen aufzuzeigen, die diese Atherogenese bedingen. Schon während der Behandlung mit einem Nierenersatzverfahren könnte man der Atherogenese entgegenwirken. Bei chronisch Nierenkranken spielt in erster Linie die chronische Inflammation in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle [95-101].

Als Wegbereiter für eine chronische Inflammation und der darauffolgenden Atherogenese werden heute unter anderem SAH als Teil des C1 Metabolismus sowie proinflammatorische, intermediäre Monozyten angesehen. Monozyten werden in klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁺) und nichtklassische Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) eingeteilt. Die Akkumulation von Homocystein und SAH sind mit einem schlechteren kardiovaskulären Outcome bei chronisch Nierenkranken assoziiert, insbesondere SAH wurde in Vorarbeiten als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei chronisch nierenkranken Patienten herausgestellt [91, 102, 103]. Eine mögliche pathophysiologische Ursache könnte der Einfluss von SAH auf die beschleunigte Differenzierung von klassischen Monozyten zu intermediären Monozyten sein [60, 104].

Wir untersuchten in unserer Querschnittsstudie den Einfluss von unterschiedlichen Nierenersatzverfahren (HD versus HDF) auf die Monozytenheterogenität sowie die Elimination von C1 Metaboliten. Die HDF vereint konvektive und diffusive Komponenten von Hämofiltration und HD und führt dadurch zu der Elimination eines breiteren Massenspektrums an Stoffen [20]. Insbesondere die bessere Elimination urämischer Toxine scheint den Vorteil von HDF gegenüber HD zu bedingen [35]

Randomisierte Studien, die verschiedene Nierenersatzverfahren verglichen, waren bezüglich kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität widersprüchlich. So konnte zwar die prospektive ESHOL Studie [33, 34] einen signifikanten Vorteil der HDF Behandlung hinsichtlich des kardiovaskulären Überlebens von Patienten mit CKD zeigen, die ursächlichen Mechanismen bleiben bisher jedoch unklar. Andere Studien wie zum Beispiel CONTRAST [31] und die On-Line HDF Studie [32] konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass die HDF hinsichtlich der Elimination von C1 Metaboliten effektiver ist als die HD. Falls Homocystein oder SAH kausal atherogen wirken, führt die durch HDF verbesserte Elimination insbesondere von SAH wiederum über epigenetische

Regulationsmechanismen zu einer verminderten Anzahl an intermediären Monozyten. Daraus resultieren weniger kardiovaskuläre Ereignisse sowie eine verbesserte Prognose der CKD Patienten. [67, 69, 89-91, 105-107].

5.2 HD versus HDF

5.2.1 Baselinecharakteristika

Betrachtet man die Baselinecharakteristika unserer Studienkohorte, gibt es einige Besonderheiten: So waren die Patienten mit HDF Behandlung bei Studieneinschluss bereits länger dialysepflichtig, dies könnte sich auf die vermehrte Aktivierung von proinflammatorischen Monozyten [108] auswirken. Auch ein Effekt auf die Eliminationskapazität von SAH durch die Dauer der HD oder HDF Behandlung ist denkbar. Es bedarf weitere Forschung um diesen Effekt zu untersuchen.

Aus den Baselinecharakteristika geht außerdem hervor, dass in unserer HD/HDF Studie signifikant mehr Männer mit HDF behandelt wurden als mit HD. In der Literatur wird vorbeschrieben, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Aktivierung von Monozyten hat. Die Anzahl der nichtklassischen Monozyten war bei Frauen im Vergleich zu Männern erhöht, die Anzahl der klassischen Monozyten war bei Frauen geringer [109]. Bezüglich der Anzahl von Monozyten und Makrophagen im Fettgewebe konnten Kralova et al. keinen Unterschied zwischen Männern und Frauen zeigen, jedoch verfügten vor allem ältere Frauen in der Menopause im Gegensatz zu jüngeren Frauen über deutlich mehr proinflammatorische Monozyten [110]. Als Erklärung dient, dass das weibliche Hormon Östrogen in der Lage ist, antiinflammatorisch zu wirken [111, 112].

Daher könnte trotz uneinheitlicher Studienlage die höhere Anzahl an männlichen Patienten mit HDF Behandlung einen Einfluss auf das Ergebnis der Studie ausgeübt haben. Es bleibt zu untersuchen, ob weibliche Patienten vor der Menopause generell eine niedrigere Anzahl von Monozyten speziell der proinflammatorischen intermediären Monozyten im Blut aufweisen. In einer vorhergehenden Studie zeigte sich, dass ältere Männer höhere Zahlen von Monozyten aufweisen [113]. Auch in einer Studie von Al-Attar et al. konnten geschlechtsspezifische Unterschiede der Monozytensubpopulationen festgestellt werden, Männer hatten auch hier tendenziell höhere Monozytenzellzahlen, diese Ergebnisse blieben jedoch ohne statistische Signifikanz [114].

Des Weiteren waren die Patienten mit HDF Behandlung fünf Jahre jünger. Dies könnte auf einer Bias basieren, da im MVZ – welches ein jüngeres Patientenkollektiv aufweist - mehr HDF Patienten im Vergleich zur Dialysestation des Uniklinikums des Saarlandes rekrutiert

wurden. Dies könnte einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre Outcome haben, da ältere Patienten ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse sowie höhere Leukozytenzahlen aufweisen [115, 116]. Tendenziell litten deutlich weniger Patienten mit HDF Behandlung an vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankungen als Patienten mit HD Behandlung (28 % versus 45 %). 33 % aller Patienten hatten ein kardiovaskuläres Ereignis bei Follow Up [117]. Dies bestätigt, dass chronisch Nierenkranke als Hochrisikopatienten anzusehen sind [118, 119].

Des Weiteren war der mittlere Blutfluss bei HD Patienten höher, was einen positiven Effekt auf die Entfernung toxischer Metaboliten hat [120-123]. Die HDF Patienten erhielten jedoch eine signifikant längere Nierenersatzbehandlung. Eine längere Behandlungszeit ist bei HD Behandlung mit einem besseren Outcome bezüglich der Mortalität assoziiert [124]. Bei Patienten mit HDF Behandlung konnte die Behandlungszeit die Mortalität nicht senken [125], vielmehr wurde die konvektive Komponente als Hauptgrund für ein reduziertes Mortalitätsrisiko angesehen.

Einzig eine höhere Behandlungsfrequenz kann bei HDF und HD den Urea Rebound abschwächen. Der Urea Rebound ist ein Phänomen, bei dem circa 15 – 60 Minuten nach der Harnstoffentfernung durch die Dialyse eine Freisetzung von Harnstoff in den Blutkreislauf aus harnstoffspeichernden Organen und Zellen erfolgt. Dies geschieht, um ein Ungleichgewicht an Stoffen im Blut auszugleichen. Zudem hat die höhere Behandlungsfrequenz einen Vorteil bezüglich der Mortalität [126, 127]. In der HD/HDF Studie besteht ein Behandlungsregime von drei Mal pro Woche. Wir können deshalb keine Aussage über einen Einfluss der Behandlungsfrequenz treffen.

Es war zudem eine Tendenz zu erkennen, dass Patienten mit HD Behandlung einen höheren BMI aufwiesen als Patienten mit HDF Behandlung. Paradoxe Weise ist bei Dialysepatienten ein höherer BMI mit einem besseren Outcome hinsichtlich der Mortalität assoziiert [128-131]. Diese Einflussfaktoren könnten eine fehlende Überlegenheit in der HD/HDF Studie von HDF über HD hinsichtlich des kardiovaskulären Outcomes und der Mortalität erklären.

5.2.2 Monozytensubpopulationen

Intermediäre Monozyten konnten in Vorarbeiten als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei chronisch nierenkranken Patienten herausgestellt werden [56, 59-61, 132]. Carracedo et al. beschrieben zudem eine signifikant geringere Zellzahl der proinflammatorischen Monozyten bei Patienten mit CKD und HDF Behandlung im Vergleich

zu HD Behandlung [64]. Hohe Zellzahlen der intermediären Monozyten spielen eine prognostische Rolle bei akuter Herzinsuffizienz [133]. Auch bei rheumatoider Arthritis konnten hohe CD14+CD16+ Monozytenzellzahlen gemessen werden und mit einer persistierenden Entzündung der Gelenke in Verbindung gebracht werden [134, 135]. Dies zeigt die Rolle der proinflammatorischen Monozyten als prognostischen Marker. In einer Studie von Olsson et al. konnte gezeigt werden, dass vor allem das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, auch CCL2) bei Patienten mit HD, Peritonealdialyse, sowie HDF Behandlung signifikant erhöht ist. MCP-1 fungiert als zentrales Zytokin bei der Chemotaxis der Monozyten und ihrer inflammatorischen Antwort [136]. Eine inflammatorische Antwort bedeutet hier die verstärkte Ausschüttung von Zytokinen, die wiederum zu einer vermehrten Expression von CD 16 führt. Zudem werden auch Zytokine von den proinflammatorischen Monozyten selbst ausgeschüttet und so neue Entzündungszellen rekrutiert. Interessanterweise wurden später HD und HDF hinsichtlich ihrer inflammatorischen Antwort verglichen und es wurde postuliert, dass HDF die inflammatorische Antwort im Vergleich zu HD verbessern könnte [137]. Dies kann einer besseren Eliminierung von Zytokinen durch die konvektive Komponente der HDF zugrunde liegen. Eine bessere Eliminierung von Zytokinen kann auch zum Nachteil für Patienten mit HDF Behandlung werden. Isolierte Monozyten von HDF Patienten, die *in vitro* mit dem Herpes-simplex-Virus 2 infiziert wurden, konnten das Virus aufgrund signifikant geringerer Zytokinwerte im Vergleich zu Monozyten gesunder Probanden nicht ausreichend bekämpfen. Die Virusreplikation in den Monozyten von HDF Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe war signifikant beschleunigt [138]. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass eine Balance zwischen der Senkung von proinflammatorischen intermediären Monozyten und der Erhaltung der Monozytensubpopulation als unverzichtbare Immunzellen unabdingbar ist. Die Senkung der CD16+ Monozyten bei Umstellung von vierwöchiger HD auf vierwöchige HDF hat einen bedeutenden positiven Einfluss auf die chronische Inflammation der HDF Patienten mit weniger proinflammatorischen Monozyten [64]. 2014 untersuchte den Hoedt et al. innerhalb der CONTRAST Kohorte, ob es einen Unterschied zwischen der HDF und HD Patientengruppe hinsichtlich des inflammatorischen Status der Patienten gibt. Als inflammatorische Marker wurden das CRP und Interleukin-6 (IL-6) sowie das Serumalbumin im Blut von 405 Studienpatienten über 3 Jahre herangezogen. In der mit HD behandelten Gruppe stiegen sowohl der Wert des CRP als auch der des IL-6. Die Änderungsrate dieser zwei Parameter war zwischen der HD und der HDF Gruppe signifikant. So stieg der CRP Wert bei Patienten unter HD um 20% pro Jahr im Vergleich zur HDF Gruppe und der IL-6

Wert um 16% bei der HD Gruppe im Vergleich zur HDF Gruppe. Der Albuminwert wurde bei 705 Patienten gemessen, die Änderungsrate des Albuminwertes unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen [139].

Neben Monozytenzellzahlen konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten mit Hämofiltration eine bessere Granulozytenfunktion aufweisen als Patienten mit HD-Behandlung und Proteine, die Granulozyten inhibieren, durch ein konvektives Verfahren besser eliminiert werden. [140, 141].

In unserer Studie konnten wir bei Baseline keinen Unterschied in der Höhe der Monozytenzellzahlen vor der Behandlung mit HDF versus HD feststellen. HDF hat in unserer Studie keinen Vorteil der HDF Behandlung auf den Anteil der intermediären Monozyten gemessen an den Gesamtmonozyten gezeigt.

Auch die Differenz der Monozytenzahlen in den verschiedenen Subpopulationen vor und nach der Behandlung unterschied sich zwischen den beiden Verfahren nicht. Die Studienlage ist dahingehend kontrovers: Eine transiente Leukopenie bei der HD Behandlung wurde vorbeschrieben [142]. Der Kontakt des Blutes der Patienten mit Dialysemembranen führt zu einer Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems. Vor allem aktivierte Granulozyten adhären im weiteren Verlauf vorübergehend an das Gefäßendothel der Lunge [143, 144]. Unter den Monozyten wurde für die CD16+ Monozyten ein vorübergehender Abfall in den ersten 10 Minuten einer Hämodialyse vorbeschrieben [145]. Es stellte sich die Frage, ob sich die Monozyten an vorbestehende atherosklerotische Plaques anheften und dort über Entzündungsprozesse zur weiteren Plaqueanlagerung führen und so zur Progression der Atherosklerose führen [58]. Deshalb stellte Rogacev et al. 2009 einen Zusammenhang der transienten Monozytopenie bei HD Behandlung und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen her. Überraschenderweise kam die Studie zu dem Schluss, dass Patienten mit einem geringeren Abfall von CD14++CD16+ Monozyten mehr kardiovaskuläre Ereignisse erlitten, als die Patienten mit einem größeren Zellzahlabfall dieser Monozyten. Auch nach Korrektur für multivariate Einflussfaktoren konnte ein schwächerer Abfall der CD14++CD16+ Monozyten als stärkster Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse herausgestellt werden. Die geringere Senkung von Monozyten könnte ein Ausdruck einer fehlerhaften Funktion der Monozyten zu sein, da sie auf den Reiz durch die Dialysemembran nicht reagieren, sondern die immunologische Antwort über die Komplementkaskade bei Dialysepatienten abgeschwächt erscheint [145].

In einer prospektiven Crossover-Studie zeigten Carracedo et al., dass die konvektive Komponente der HDF zu niedrigeren Zellzahlen von CD14+CD16+ Monozyten im Vergleich zur HD führt. Umgekehrt führte ein Wechsel von HDF zu HD zu einem Anstieg der CD14+CD16+ Monozytenzellzahlen [64]. Wir unterschieden innerhalb der CD16 positiven Monozyten nochmals in intermediäre und nichtklassische Monozyten, was die Gegensätzlichkeit unserer Ergebnisse zu denen von Carracedo erklären könnte, die in ihrer Studie lediglich die Höhe der nichtklassischen Monozyten subpopulationen auswerteten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Zellzahlen der Leukozyten, der Monozyten sowie deren Monozyten subpopulationen in der vorliegenden HD/HDF Studie zwischen den Messzeitpunkten vor und nach Dialyse wieder auf das Anfangslevel normalisiert haben und der Zeitpunkt einer transienten Leukopenie nicht erfasst wurde. Um die Höhe der Zellzahlen im Zeitverlauf der Behandlung zu erfassen, müsste man mehrere Messzeitpunkte einführen. Es bedarf weiterer Studien, um eine Aussage über eine kurz- und langfristige Senkung von Monozyten subpopulationen und auch über die Senkung von Zytokinen und die Infektanfälligkeit der Patienten mit HDF Behandlung treffen zu können.

5.2.3 C1 Metaboliten

Wesentliche Bestandteile des Ein-Kohlenstoff Metabolismus sind Homocystein, SAH und SAM. Der C1 Metabolismus spielt aufgrund zahlreicher Methylierungsreaktionen eine zentrale Rolle im epigenetischen Regulationsmechanismus des Menschen. SAM ist ein universeller Methylgruppendonor, der unter anderem an der DNA-Methylierung beteiligt ist. Nach Abgabe der SAM-Methylgruppe entsteht irreversibel SAH, das mit Homocystein im Gleichgewicht steht und Methyltransferasen hemmt.

Bei chronisch Nierenkranken finden sich erhöhte Werte von Homocystein und SAH im Blut [65, 66, 88, 94, 146-150]. Die erhöhten Spiegel wurden in Vorarbeiten als Wegbereiter einer Veränderung epigenetischer Regulationsmechanismen beschrieben [39, 102, 103, 105, 106]. Bei der Verschiebung von klassischen Monozyten hin zu proinflammatorischen, intermediären Monozyten wird eine mögliche kausale Bedeutung der C1 Metaboliten Homocystein, SAH und SAM angenommen [151].

Es besteht eine starke Assoziation zwischen Hyperhomocysteinämie und dem Auftreten von Atherosklerose [152-154]. Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen zu hohen Homocysteinplasmaspiegeln und Hyperurikämie [105]. Die Akkumulation von Homocystein bei nierenkranken Patienten lässt sich durch die entscheidende Rolle der Niere beim Abbau

von Homocystein erklären. Homocystein wird neben der oben beschriebenen Remethylierung auch durch eine renale Transsulfurierungsreaktion zu Glutathion verstoffwechselt [155]. Diese Transsulfurierung kann prinzipiell ubiquitär stattfinden, es wird jedoch angenommen, dass es durch geschädigtes Nierengewebe zu einer Akkumulation von Homocystein kommt und das Abbauprodukt und Antioxidans Glutathion vermindert anfällt. Zudem entsteht bei der Transsulfurierung als Zwischenprodukt Schwefelwasserstoff, das auch eine antioxidative Wirkung hat [156]. Bei nierenkranken Patienten findet man jedoch niedrigere Schwefelwasserstoff-Konzentrationen, was einerseits einen mangelnden Abbau von Homocystein nahe legt, sowie zu zusätzlichen Schäden der Nierenzellen führt [157].

Die Senkung von Homocystein durch Folsäure sowie Vitamin B12 Supplementation hatte in mehreren Studien keinen Benefit auf das kardiovaskuläre Outcome der behandelten Patienten [72, 76, 80, 158-162]. In einer Metaanalyse randomisierter Kontrollstudien von Li et al. wurde erneut der Einfluss der Folsäuregabe auf das kardiovaskuläre Outcome untersucht [163]. Hier zeigte sich durch Folsäuresupplementierung ein geringeres Risiko der Patienten, einen Schlaganfall oder eine generelle kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden. Interessanterweise war der Vorteil für diejenigen Patienten am größten, die niedrigere Folsäurespiegel hatten und keine vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankungen, sowie in den Studien, in denen der Homocysteinspiegel stärker abfiel. Hier könnte sich der fehlende Effekt bei chronisch nierenkranken Patienten erklären: Chronisch Nierenkranke haben eine hohe Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen [164], daher könnten sie weniger von einer Senkung des Homocysteinspiegels im Blut profitieren. Zudem könnte die Senkung von Homocystein durch eine mangelnde Eliminierung über die Nieren nicht so stark ausfallen wie bei nierengesunden Menschen. Im Gegensatz dazu zeigten Xu et al., dass sich durch eine kombinierte Gabe eines blutdrucksenkenden Medikaments (Angiotensin-Converting-Enzyme Hemmer, Enalapril) mit Folsäure sehr wohl die Progression der chronischen Nierenerkrankung beeinflussen lässt. Hier wurden jedoch lediglich Patienten mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von 30 ml/min und höher eingeschlossen, sodass sich das Ergebnis nicht auf Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz übertragen lässt [165]. Im Fokus steht daher SAH, das sich durch Folsäure oder Vitamin B12 Gabe nicht senken lassen kann [84, 94, 166-168]. Es ist von zentraler Bedeutung, mögliche Interventionen zu identifizieren, die den SAH Plasmaspiegel senken können [80].

SAH ist neben Cystathionin einer der Hauptmetaboliten im Transsulfurierungsweg von Homocystein. Die Niere ist das zentrale Organ für die Elimination von SAH [92]. Ein Verlust der Nierenfunktion führt daher auch zur Akkumulation von SAH bei Patienten mit

chronischer Nierenerkrankung [91]. Ein möglicher Ansatz könnte die Umstellung dialysepflichtiger Patienten auf die HDF Behandlung sein, wenn HDF aufgrund der Kombination aus Diffusion und Konvektion SAH effektiver eliminiert als HD.

In der Literatur ist eine verbesserte Elimination von Homocystein durch HDF im Vergleich zu HD vorbeschrieben [169], in der HD/HDF Studie konnten in den Baselinecharakteristika keine niedrigeren Spiegel von Homocystein, SAH oder SAM bei den Patienten mit HDF Behandlung nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigte sich bei HDF Patienten jedoch eine geringgradig höhere Reduktionsrate von SAH. Die diskret stärkere Reduktion von SAH könnte durch eine bessere Elimination aufgrund der Konvektion bei HDF erklärt werden. Homocystein, SAH und SAM liegen sowohl in freier als auch in protein-gebundener Form vor. In Vorarbeiten gibt es sowohl Hinweise auf eine bessere Eliminierung ungebundener Stoffe durch die konvektive Modalität der HDF [170] als auch Daten, dass protein-gebundene Toxine und Bindungsproteine wie Albumin [171] durch die HDF in höherem Maße eliminiert werden [172]. Auch β 2-Mikroglobulin, eine lösliche Proteinuntereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse 1, wird durch HDF langfristig besser gesenkt [173-175]. Als Bindungsproteine von SAH und SAM konnten in Vorarbeiten zum Beispiel Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAHH) beschrieben werden [176-178]. Vorwiegend liegen SAH und SAM jedoch ungebunden vor [179]. Homocystein liegt stark proteingebunden vor [172, 180]. Die HDF kann proteingebundene Stoffe im Gegensatz zu HD besser eliminieren [170, 181].

Methodisch war es uns in der HD/HDF Studie nicht möglich, zwischen den freien und den proteingebundenen Formen der C1 Metaboliten zu unterscheiden. Es bleibt somit zu klären, ob die Serumspiegel von Homocystein versus SAH und SAM unterschiedlich auf HD und HDF Behandlung reagieren und was diesen Reaktionen zugrunde liegt.

5.2.4 5-mc DNA Methylierung

SAH ist ein kompetitiver Hemmer von DNA-Methylierungsreaktionen [182]. Die DNA kann von DNA Methyltransferasen (DNMTs) durch Methylierung an Cytosinbasen (5-mc) modifiziert werden. Die Methylierungsreaktion vermindert die Genexpression. Beispielsweise kann ein Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen [183] hergestellt werden, zudem spielt die DNA Methylierung eine Rolle beim Alterungsprozess [184]. Epigenetisch zeigen sich in Krebszellen eine globale DNA Demethylierung und eine Hypermethylierung in der Promotorregion. Eine andere Studie zeigt die Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Atherogenese und kardiovaskulären Erkrankungen auf [185]. Hier waren hypermethylierte Gene vor allem in Signalwegen im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel gefunden worden, hypomethylierte Gene fanden sich in Signalwegen der Immunantwort. Im Hinblick auf die DNA chronisch nierenkranker Patienten mit Nierenersatzbehandlung besteht nach wie vor eine kontroverse Studienlage hinsichtlich der Hypomethylierung [186] und Hypermethylierung [187, 188]. Sowohl gesteigerte als auch verminderte DNA Methylierung konnte für konventionelle HD, high-flux HD und PD nachgewiesen werden [186, 187, 189, 190]. Ghigolea et al. konnten nachweisen, dass die globale 5-mc DNA bei Dialysepatienten höher war als bei den Kontrollpersonen und die 5-mc DNA bei HDF Patienten signifikant geringer war als bei HD Patienten [189]. Somit kann ein Zusammenhang zwischen SAH und der Genexpression auch unabhängig von Homocystein bestehen.

5.4 Sonstige Effekte

5.4.1 Blutdruckdifferenzen während HD und HDF Behandlung

Die Ergebnisse der HD/HDF Studie zeigten eine Überlegenheit der HDF Behandlung hinsichtlich der Blutdruckdifferenz vor und nach der Behandlung. In unserer HD/HDF Studie unterschieden sich bei Baseline weder der systolische, der diastolische noch der mittlere Blutdruckwert vor der HD oder HDF Behandlung. Tendenziell hatten alle Patienten nach der Behandlung mit HDF Behandlung geringere systolische, diastolische und mittlere Blutdruckwerte, was jedoch die Signifikanz verfehlte. Interessanterweise unterschied sich aber die Änderungsrate sowohl des systolischen als auch des mittleren Blutdrucks signifikant zwischen den Patienten mit HD Behandlung und denen mit HDF Behandlung. Der systolische Blutdruck bei der HD Behandlung sank von 131 ± 18 mmHg auf 119 ± 23 mmHg ab, während der HDF Behandlung von 132 ± 17 mmHg auf 128 ± 21 mmHg. Der

mittlere Blutdruck vor und nach HD Behandlung sank von 92 ± 12 mmHg auf 85 ± 14 mmHg ab, bei HDF Behandlung sank er lediglich von 92 ± 12 mmHg auf 90 ± 13 mmHg ab. Während der Dialysesitzung wurden keine Symptome der Hypotension erfasst, weshalb man nicht von einer symptomatischen Hypotension der Patienten mit HD Behandlung sprechen kann.

Eine häufige Komplikation der Nierenersatzbehandlung ist die symptomatische Hypotension während der HD. Sie ist definiert als Abfall des systolischen Blutdruckes um ≥ 20 mmHg oder des mittleren Blutdruckes um ≥ 10 mmHg, dem Vorhandensein von ischämischen Symptomen und der Notwendigkeit eines Eingreifens durch eine Dialysefachkraft während der Nierenersatzbehandlung [191]. Sie tritt laut der National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative in ungefähr 20 - 30 % aller HD Behandlungen auf [192].

Große Schwankungen des systolischen Blutdrucks während der Nierenersatzbehandlung führen zu einem häufigeren Auftreten von Tod jedweder Genese und Tod kardiovaskulärer Genese [193]. Park et al. zeigten, dass ein hoher Abfall des systolischen (-30 mmHg) und diastolischen (-15 mmHg) Blutdrucks zu erhöhter Mortalität führte, wohingegen moderate Absenkungen des systolischen (<30 mmHg) und des diastolischen Blutdrucks (<15 mmHg) mit der höchsten Überlebensrate assoziiert waren [194]. Des Weiteren ist die symptomatische Hypotension mit dem Auftreten von Myokardinfarkten, der Krankenhauseinweisung aufgrund von volumeninduzierter Herzinsuffizienz, der kardiovaskulären Mortalität und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert [195].

In der Literatur werden verschieden Gründe diskutiert, die zu solch einer Hypotension führen. Ein Grund ist die Bluttemperatur der Patienten während der Behandlung. Die HD Behandlung führt zu einem Anstieg der Bluttemperatur, die verschiedene Ursachen hat: Die Körperkerntemperatur vieler Dialysepatienten ist niedriger als die der gesunden Bevölkerung, die hohe Temperatur des Dialysats (37 °C) führt so zu einem Anstieg der Temperatur im Blut der behandelten Patienten [196]. Zudem führt der Kontakt von Blut an der Dialysemembran zu einer Zytokinfreisetzung. Diese Zytokine haben einen pyrogenen Effekt, der die Körperkerntemperatur erhöht [197]. Die Folgen eines Temperaturanstieges im Blut ist ein Tonusverlust der Gefäße, worauf hin es zur Hypotension kommt [198].

Die HDF scheint durch die konvektive Komponente einen positiven Einfluss auf die Blutdruckstabilität während der Behandlung zu haben. Hierzu werden verschiedene Ursachen diskutiert: bei der HDF werden Ersatzlösungen mit Raumtemperatur verwendet [199], es

kommt zu einer unterschiedlichen Reaktion der Gefäße [200], außerdem unterscheiden sich Konvektion und Diffusion in ihrer Clearance von gelösten Stoffen [201, 202].

Donauer et al untersuchten 2004 das Auftreten symptomatischer Hypotension bei On-Line Postdilutions HDF, bei konventioneller HD und bei temperaturgesteuerter HD. Interessanterweise zeigte sich, dass die HDF zu besserer hämodynamischer Stabilität führte, da bei On-Line HDF Patienten eine automatische Abkühlung des Blutes stattfand [203]. Auch Locatelli zeigte dahingehend, dass das konvektive Verfahren bei Dialysepflichtigen das Risiko für eine symptomatische Hypotension während der Behandlung signifikant senken kann [204]. Auch in der OL-HDF Studie von Ok et al. traten in der HDF Gruppe weniger Dialysekomplikationen wie zum Beispiel Hypotension auf [32].

5.5 HDF spezifische Faktoren

5.5.1 HDF Modalität und Konvektionsvolumen

Da die HDF im Prä- oder Postdilutionsmodus gesteuert werden kann, interessierte uns, ob sich die Modalität der HDF auf die Monozytenheterogenität und die Elimination der C1 Metaboliten während der Behandlung auf unserer Studienpatienten auswirkte. Der On-line HDF Prädilutionsmodus ist dem Postdilutionsmodus hinsichtlich der Elimination von urämischen Toxinen, beispielsweise auch Homocystein und kleinmolekularen Molekülen überlegen. Des Weiteren beschreiben Tsuchida et al., dass es im Prädilutionsmodus zu verminderter Synthese von Zytokinen kommt und zudem der Blutdruck im Gegensatz zum Postdilutionsmodus stabil bleibt [205]. Im Gegensatz dazu zeigte Maduell et al., dass im Postdilutionsmodus im Vergleich zum Prädilutionsmodus bessere Eliminationsraten von Harnstoff und Kreatinin erreicht werden können [206].

In unserer HD/HDF Studie konnten wir keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Einflusses der HDF Modalität auf die Monozytenheterogenität oder die Elimination von C1 Metaboliten zeigen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass von den 46 Patienten in der HDF Kohorte nur 11 Patienten im Prädilutionsmodus behandelt wurden.

In einer prospektiven Cross-over Studie von Ariza et al. wurde untersucht, ob der Mid-Dilution Modus [207, 208], der Post- und Prädilutionsmodus vereint, im Gegensatz zu dem Postdilutionsmodus einen unterschiedlichen Einfluss auf die Mikroinflammation und endotheliale Reparatur sowie das Schädigungsmuster des Endothels hat. Durchflusszytometrisch wurden unter anderem die CD16+-positiven Monozyten als Marker

für Inflammation gemessen. Diese Studie kam jedoch zu dem Ergebnis, dass einzig eine Steigerung des konvektiven Transports zu einer Verbesserung von mikroinflammatorischen Prozessen und endothelialen Reparaturvorgängen führte [209]. Diese Beobachtung machten auch Davenport et al.: sie zeigten, dass ein höherer konvektiver Volumenaustausch zu einem Überlebensvorteil von Dialysepatienten führt [210]. Bei einer HDF Behandlung entsteht ein höherer transmembranärer Fluss, der wiederum zu einem höheren Konvektionsvolumen führt. In einer retrospektiven Studie von Canaud et al. wurde untersucht, ob ein bestimmter Schwellenwert oder ein optimaler Bereich des Konvektionsvolumens Überlebensvorteile bringen könnte. Ab einem Konvektionsvolumen von 55 Litern bis 74 Liter pro Woche stieg die relative Überlebensrate der Patienten unter Online-HDF Behandlung an. Es konnte zudem ein linearer Abfall abhängig von der Steigerung des Konvektionsvolumens von β_2 -Mikroglobulin, als Marker mittelgroßer urämischer Toxine, als auch des CRP im Blut der Online-HDF Patienten aufgezeigt werden [25]. In unserer HD/HDF Studie wirkte sich ein höheres Konvektionsvolumen nicht signifikant auf die Monozytensubpopulationen und den C1 Metabolismus aus. Das Konvektionsvolumen wurde nur bei circa 39% der HDF Patienten gemessen. Aufgrund der niedrigen Fallzahl ließ sich keine Aussage über die Signifikanz treffen.

5.6 Limitationen

Die HD/HDF Studie weist einige Limitationen auf, die im Folgenden dargestellt werden:

Die unterschiedliche Verteilung von HD und HDF Patienten an beiden Studienorten könnte die Studienergebnisse beeinflussen, da in der Heimdialyse mehr Patienten mit HDF behandelt wurden. Der Transportweg der Serumproben für die Bestimmung von Homocystein, SAH und SAM in das Labor war bei Patienten in der Heimdialyse länger. Aufgrund einer kontinuierlichen Synthese und Freisetzung von Homocystein aus Blutzellen bei Raumtemperatur, kann eine längere Transportzeit zu einem artifiziell höher gemessenen Homocysteinplasmaspiegel führen. In der Literatur wird empfohlen die Plasmaproben sofort zu kühlen und innerhalb einer Stunde zu zentrifugieren, um falsch hoch gemessene Homocysteinplasmaspiegel zu vermeiden [211]. Zusätzlich könnte die Höhe der C1 Metaboliten aufgrund einer veränderten Erythrozytenzellzahl beeinflusst worden sein, so führt eine niedrigere Anzahl an Erythrozyten im Blut zu einem niedrigeren Spiegel an Homocystein [212, 213]. Um die beschriebenen Effekte zu minimieren, wurden die Blutproben sofort gekühlt und innerhalb von 45 Minuten zum Labor gebracht.

Eine weitere potentielle Limitation ist, dass Homocystein, SAH und SAM im Plasma bestimmt wurden. In einer vorhergehenden Studie wurden aber dem intrazellulären Homocysteinwert sowie dem intrazellulären SAH und SAM Wert eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose und der DNA Hypomethylierung zugeschrieben [214-216]. Es wurde in der vorliegenden Studie außerdem keine Unterscheidung zwischen proteingebundenem und freiem Homocystein gemacht. Über die Hälfte des Homocysteins ist an Proteine gebunden und ein unterschiedliches Verhältnis von gebundener zu freier Form könnte die Ergebnisse unserer Studie beeinflusst haben [211]. Zwar können Proteine technisch identifiziert werden, an welche SAH und SAM binden [176], es bedarf aber weiterer Forschung, um eine Aussage über den Einfluss der Bindungsproteine auf die C1 Metaboliten zu treffen. Aus methodischen Gründen konnte in unserer Studie keine Unterscheidung zwischen proteingebundener und freier Form getroffen werden.

Eine weitere Limitation ist, dass die Werte der klinischen Chemie und das Differentialblutbild der Probanden der Heimdialyse in einem anderen Labor erhoben wurden als die der Patienten im Uniklinikum. Zudem wurde nicht bei allen Patienten ein Differentialblutbild vor der Behandlung erhoben. Nach der Behandlung wurde ein Differentialblutbild aus organisatorischen Gründen nur bei Patienten erhoben, die morgens ihre Behandlung bekamen. Dies führte dazu, dass die Auswertung nur mit prozentualen Angaben der Monozytensubpopulationen gemacht werden konnte. Die Uniklinik behandelt tendenziell ältere und kränkere Patienten als die Heimdialyse, setzte gleichzeitig jedoch seltener HDF ein. Daraus könnte eine reverse Kausalität resultieren, da gesündere Patienten präferentiell in der Heimdialyse behandelt wurden und hier präferentiell eine HDF Behandlung erhielten, während kränkere Patienten häufiger in der Uniklinik behandelt wurden und hier präferentiell eine HD Behandlung erhielten. Somit könnte die Wahl des Nierenersatzverfahrens nicht Ursache, sondern Folge der hohen Komorbidität sein.

Im Follow Up erhielten wir keine Informationen über den Zeitpunkt eines kardiovaskulären Ereignisses. Dies hatte zur Folge, dass keine Überlebenszeitkurven dargestellt werden konnten, obgleich die Nachverfolgungszeit nicht für alle Patienten identisch war. Auch über die Todesursache lagen keine detaillierten Informationen vor und bei verstorbenen Patienten konnte keine Aussage über stattgehabte kardiovaskuläre Ereignisse zwischen dem Studieneinschluss und dem Todeszeitpunkt gemacht werden. Somit konnte nur ein kombinierter Endpunkt aus kardiovaskulären Ereignissen und Todesfall untersucht werden.

Schließlich wurde in der HDF Gruppe bei vielen Patienten kein Substitutionsvolumen dokumentiert, was dazu führte, dass nur bei 18 Patienten das Konvektionsvolumen ausgerechnet werden konnte. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Intensität der HDF in Subgruppenanalysen randomisierter Studien mit späteren kardiovaskulären Ereignissen assoziiert werden konnte [217-220].

5.7 Zusammenfassung/Ausblick

Zusammenfassend zeigten sich in der HD/HDF Studie bei Patienten mit HDF Behandlung einerseits keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen von einzelnen Monozytensubpopulationen im Vergleich zu Patienten mit einer HD Behandlung. Wir konnten die Ergebnisse der Studie von Carracedo et al. somit nicht bestätigen [64]. Mögliche Ursache ist zunächst, dass wir die immunologischen Untersuchungen gemäß Expertenkonsensus zur Charakterisierung von Monozytensubpopulationen bestimmten [44, 221, 222]. So setzten wir in der FACS Analyse einen Panmonozytenmarker ein und erfassten insbesondere die intermediären Monozyten als eigene Monozytensubpopulation. Dies steht im Gegensatz zur Studie von Carracedo et al., in deren Auswertung lediglich die CD14+ CD16+ Monozyten berücksichtigt wurden. Zum anderen war unsere Studie im Gegensatz zur Studie von Carracedo et al. eine Kohortenstudie, keine randomisierte Studie.

Andererseits konnte hinsichtlich der Metaboliten des Einkohlenstoffmetabolismus in der HD/HDF Studie eine geringgradig bessere Elimination von SAH durch HDF im Vergleich zur HD Behandlung gezeigt werden. SAH ist ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor chronisch nierenkranker Menschen [90, 91] und spielt als solcher insbesondere bei der epigenetischen Dysregulation eine wichtige Rolle [223]. Da sich jedoch keinerlei Unterschiede der SAH Plasmaspiegel nach dem langen interdialytischen Intervall bei Patienten mit HDF Behandlung im Vergleich zur HD Behandlung zeigten, bleibt die klinische Relevanz der verbesserten intradialytischen SAH Elimination zu klären. Weitere Studien mit randomisiert kontrolliertem Studiendesign sollen klären, ob eine effektivere SAH Elimination einen positiven Effekt auf epigenetischer Ebene ausüben kann. Es könnte zusätzlich zur Messung von SAH geklärt werden, ob die HDF zu vermehrter oder verminderter DNA Methylierung führen kann. Zu berücksichtigen wären sowohl ein unmittelbarer sowie ein chronischer Therapieeffekt der HDF. Erste klinische Daten suggerierten, dass es bei Patienten mit HDF Behandlung zu weniger DNA Methylierung im Vergleich zu Patienten mit HD Behandlung kommt [189]. In Zukunft könnte man in einer Längsschnittstudie mit längerem

Beobachtungszeitraum als er in unserer Studie gegeben war, den Einfluss von DNA Methylierung auf den SAH Plasmaspiegel und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse untersuchen, sowie die Rolle des Nierenersatzverfahrens (HD versus HDF) auf diese Parameter evaluieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Abel, J.J., L.G. Rowntree, and B.B. Turner, On the removal of diffusible substances from the circulating blood by means of dialysis. Transactions of the Association of American Physicians, 1913. *Transfus Sci*, 1990. 11(2): p. 164-5.
2. Eknoyan, G., The wonderful apparatus of John Jacob Abel called the "artificial kidney". *Semin Dial*, 2009. 22(3): p. 287-96.
3. Graham, T., The Bakerian lecture: Osmotic force. *Philos Trans R Soc Lond*, 1854. 144: p. 117-128.
4. Graham, T., A short account of experimental researches on the diffusion of gases through each other, and their separation by mechanical means. *Quar. J. Sci.*, 1829. 2: p. 74-83.
5. Pregl, F., Beiträge zur Methodik des Dialysierverfahrens von E. Aberhalden. *Fermentforschung*, 1914. 1: p. 7-12.
6. Paskalev, D., Georg Haas (1886-1971): The Forgotten Hemodialysis Pioneer. *Dialysis & Transplantation*, 2001. 30(12): p. 828-832.
7. Wizemann, V. and J. Benedum, Nephrology dialysis transplantation 70th anniversary of haemodialysis--the pioneering contribution of Georg Haas (1886-1971). *Nephrol Dial Transplant*, 1994. 9(12): p. 1829-31.
8. Haas, G., Versuche der Blutauswaschung am Lebenden mit Hilfe der Dialyse. *Klin Wochenschr*, 1925. 4(1): p. 13-14.
9. Haas, G., Über Blutauswaschung. *Klin Wochenschr*, 1928. 7(29): p. 1356-1362.
10. Kolff W, B.H., The artificial kidney: A dialyser with a great area. *Acta Med Scand*, 1944. 117: p. 121-134.
11. Haycraft, J.B., *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol*, 1884. 18: p. 209-217.
12. Benedum, J., Georg Haas (1886-1971): Pionier der Hämodialyse. *Medizinhistorisches Journal*, 1979. 14: p. 196-217.
13. Howell, W.H., Holt L., Two new factors in blood coagulation-heparin and proantithrombin. *Amer. J. Physiol.*, 1918. 47: p. 328.
14. Quinton, W., D. Dillard, and B.H. Scribner, Cannulation of blood vessels for prolonged hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 1960. 6: p. 104-13.
15. Blagg, C.R., The 50th anniversary of long-term hemodialysis: University of Washington Hospital, March 9th, 1960. *J Nephrol*, 2011. 24 Suppl 17: p. S84-8.
16. Malinow, M.R. and W. Korzon, An Experimental Method for Obtaining an Ultrafiltrate of the Blood. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1947. 32(4): p. 461-471.
17. Ronco, C., Hemodiafiltration: Technical and Clinical Issues. *Blood Purif*, 2015. 40 Suppl 1: p. 2-11.
18. Henderson, L.W., et al., Kinetics of hemodiafiltration. II. Clinical characterization of a new blood cleansing modality. 1975. *J Am Soc Nephrol*, 1997. 8(3): p. 494-508; discussion 494-5, 497-500.
19. Henderson, L., Biophysics of ultrafiltration and hemofiltration. *Replacement of Renal Function by Dialysis*, Maher JF, Kluwer Academic, 1989: p. 300-326.
20. Henderson, L., Lilley JJ, Ford CA, Stone RA, Hemodiafiltration. *J Dial.*, 1977. 1(3): p. 211-238.
21. Yamashita, A.C., Diafilters for predilution and postdilution on-line hemodiafiltration. *Blood Purif*, 2013. 35 Suppl 1: p. 29-33.
22. Pedrini, L.A., On-line hemodiafiltration: technique and efficiency. *J Nephrol*, 2003. 16 Suppl 7: p. S57-63.
23. von Albertini, B., Producing on-line ultrapure dialysis fluid. *Contrib Nephrol*, 2011. 175: p. 46-56.
24. Mostovaya, I.M., et al., High convection volume in online post-dilution haemodiafiltration: relevance, safety and costs. *Clin Kidney J*, 2015. 8(4): p. 368-73.

25. Canaud, B., et al., Optimal convection volume for improving patient outcomes in an international incident dialysis cohort treated with online hemodiafiltration. *Kidney Int*, 2015.
26. Go, A.S., et al., Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*, 2004. 351(13): p. 1296-305.
27. Sarnak, M.J., et al., Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 2003. 108(17): p. 2154-69.
28. O'Riordan, E., et al., Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292(1): p. H285-94.
29. Goligorsky, M.S., Clinical assessment of endothelial dysfunction: combine and rule. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006. 15(6): p. 617-24.
30. Goligorsky, M.S., Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold. *Kidney Res Clin Pract*, 2015. 34(2): p. 76-82.
31. Grooteman, M.P., et al., Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(6): p. 1087-96.
32. Ok, E., 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): p. 192-202.
33. Maduell, F., et al., Design and patient characteristics of ESHOL study, a Catalonian prospective randomized study. *J Nephrol*, 2011. 24(2): p. 196-202.
34. Maduell, F., et al., High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 2013. 24(3): p. 487-97.
35. Kim, S., On-line haemodiafiltration: Effective removal of high molecular weight toxins and improvement in clinical manifestations of chronic haemodialysis patients. *Neprology*, 1996. 2(1): p. 183-186.
36. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
37. Heine, G.H., et al., Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2012. 8(6): p. 362-9.
38. Duranton, F., et al., Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(7): p. 1258-70.
39. Stenvinkel, P., et al., 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*, 2005. 67(4): p. 1216-33.
40. Ogawa, M., Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 1993. 81(11): p. 2844-53.
41. Ash, R.C., D.A. Detrick, and E.D. Zanjani, Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro. *Blood*, 1981. 58(2): p. 309-16.
42. Najjar, H.M., et al., Differentiation of human monocytes into accessory cells at serum-free conditions. *Eur J Cell Biol*, 1990. 51(2): p. 339-46.
43. Peters, J.H., et al., Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology*, 1991. 59(3): p. 122-6.
44. Ziegler-Heitbrock, L., et al., Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010. 116(16): p. E74-E80.
45. Zawada, A.M., et al., SuperSAGE evidence for CD14⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, 2011. 118(12): p. e50-61.
46. Passlick, B., D. Flieger, and H.W.L. Zieglerheitbrock, Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral-Blood. *Blood*, 1989. 74(7): p. 2527-2534.
47. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Definition of human blood monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000. 67(5): p. 603-606.
48. Hansson, G.K., Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 2005. 352(16): p. 1685-1695.

49. Hansson, G.K. and P. Libby, The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 2006. 6(7): p. 508-519.
50. Woollard, K.J. and F. Geissmann, Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature Reviews Cardiology*, 2010. 7(2): p. 77-86.
51. Weber, C. and H. Noels, Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*, 2011. 17(11): p. 1410-1422.
52. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 317-25.
53. Alamanda, V., et al., Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 418(1): p. 56-61.
54. Eriksson, E.E., et al., Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and alpha(4) integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ Res*, 2000. 86(5): p. 526-33.
55. Hristov, M. and C. Weber, Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2011. 106(5): p. 757-62.
56. Hristov, M. and G.H. Heine, Monocyte subsets in atherosclerosis. *Hamostaseologie*, 2015. 35(2): p. 105-12.
57. Schlitt, A., et al., CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*, 2004. 92(2): p. 419-24.
58. Sester, U., et al., Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. 16(7): p. 1402-8.
59. Heine, G.H., et al., CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int*, 2008. 73(5): p. 622-9.
60. Rogacev, K.S., et al., CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J*, 2011. 32(1): p. 84-92.
61. Rogacev, K.S., et al., Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14++CD16+ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(9): p. 2120-7.
62. Zawada, A.M., et al., Comparison of two different strategies for human monocyte subsets gating within the large-scale prospective CARE FOR HOME Study. *Cytometry A*, 2015. 87(8): p. 750-8.
63. Rogacev, K.S., et al., CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(16): p. 1512-20.
64. Carracedo, J., et al., On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(8): p. 2315-21.
65. Zhang, D., et al., Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation*, 2009. 120(19): p. 1893-902.
66. Zhang, D., et al., Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice. *Circ Res*, 2012. 111(1): p. 37-49.
67. Perna, A.F., et al., Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin. *J Nephrol*, 1999. 12(4): p. 230-40.
68. Anderson, J.L., et al., Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation*, 2000. 102(11): p. 1227-32.
69. Mallamaci, F., et al., Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2002. 61(2): p. 609-14.

70. Nygard, O., et al., Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1997. 337(4): p. 230-6.
71. Toole, J.F., et al., Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*, 2004. 291(5): p. 565-75.
72. Lonn, E., et al., Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1567-77.
73. Bonna, K.H., et al., Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1578-88.
74. Ebbing, M., et al., Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2008. 300(7): p. 795-804.
75. Albert, C.M., et al., Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA*, 2008. 299(17): p. 2027-36.
76. Study of the Effectiveness of Additional Reductions in, C., et al., Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA*, 2010. 303(24): p. 2486-94.
77. Group, V.T.S., B vitamins in patients with recent transient ischaemic attack or stroke in the VITAMins TO Prevent Stroke (VITATOPS) trial: a randomised, double-blind, parallel, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2010. 9(9): p. 855-65.
78. Zoungas, S., et al., Cardiovascular morbidity and mortality in the Atherosclerosis and Folic Acid Supplementation Trial (ASFAST) in chronic renal failure: a multicenter, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(6): p. 1108-16.
79. Jamison, R.L., et al., Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007. 298(10): p. 1163-70.
80. Mann, J.F., et al., Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in people with chronic kidney disease--results of the renal Hope-2 study. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(2): p. 645-53.
81. Heinz, J., et al., B vitamins and the risk of total mortality and cardiovascular disease in end-stage renal disease: results of a randomized controlled trial. *Circulation*, 2010. 121(12): p. 1432-8.
82. Finkelstein, J.D., W.E. Kyle, and B.J. Harris, Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys*, 1974. 165(2): p. 774-9.
83. Hubner, U., et al., Effect of 1 year B and D vitamin supplementation on LINE-1 repetitive element methylation in older subjects. *Clin Chem Lab Med*, 2013. 51(3): p. 649-55.
84. Green, T.J., et al., Homocysteine-lowering vitamins do not lower plasma S-adenosylhomocysteine in older people with elevated homocysteine concentrations. *Br J Nutr*, 2010. 103(11): p. 1629-34.
85. Liu, C., et al., Plasma S-adenosylhomocysteine is a better biomarker of atherosclerosis than homocysteine in apolipoprotein E-deficient mice fed high dietary methionine. *J Nutr*, 2008. 138(2): p. 311-5.
86. Luo, X., et al., Increased plasma S-adenosyl-homocysteine levels induce the proliferation and migration of VSMCs through an oxidative stress-ERK1/2 pathway in apoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(2): p. 241-50.
87. Sipkens, J.A., et al., S-Adenosylhomocysteine induces apoptosis and phosphatidylserine exposure in endothelial cells independent of homocysteine. *Atherosclerosis*, 2012. 221(1): p. 48-54.
88. Kerins, D.M., et al., Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(6): p. 723-9.

89. Castro, R., et al., Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem*, 2003. 49(8): p. 1292-6.
90. Zawada, A.M., et al., S-adenosylhomocysteine is associated with subclinical atherosclerosis and renal function in a cardiovascular low-risk population. *Atherosclerosis*, 2014. 234(1): p. 17-22.
91. Valli, A., et al., Elevated serum levels of S-adenosylhomocysteine, but not homocysteine, are associated with cardiovascular disease in stage 5 chronic kidney disease patients. *Clin Chim Acta*, 2008. 395(1-2): p. 106-10.
92. Garibotto, G., et al., Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin Nutr*, 2010. 29(4): p. 424-33.
93. Xiao, Y., et al., Plasma S-adenosylhomocysteine is associated with the risk of cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography: a cohort study. *Am J Clin Nutr*, 2013. 98(5): p. 1162-9.
94. Xiao, Y., et al., Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015. 67: p. 158-66.
95. Kirsch, A.H., et al., Heterogeneous susceptibility for uraemic media calcification and concomitant inflammation within the arterial tree. *Nephrol Dial Transplant*, 2015. 30(12): p. 1995-2005.
96. Patel, M.L., et al., Impact of Carotid Intima-Media Thickness on Long-term Outcome in Hemodialysis Patients. *N Am J Med Sci*, 2015. 7(6): p. 281-7.
97. Hiramoto, J.S., et al., Inflammation and coagulation markers and kidney function decline: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis*, 2012. 60(2): p. 225-32.
98. Panichi, V., S. Paoletti, and C. Consani, Inflammatory pattern in hemodiafiltration. *Contrib Nephrol*, 2008. 161: p. 185-90.
99. Panichi, V. and C. Tetta, On-line hemodiafiltration in the large RISCVID study. *Contrib Nephrol*, 2011. 175: p. 117-28.
100. Panichi, V., et al., Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCVID study. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(7): p. 2337-43.
101. Pedrini, L.A., et al., Long-term effects of high-efficiency on-line haemodiafiltration on uraemic toxicity. A multicentre prospective randomized study. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. 26(8): p. 2617-24.
102. Ingrosso, D. and A.F. Perna, Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1790(9): p. 892-9.
103. Perna, A.F., et al., Hyperhomocysteinemia in uremia--a red flag in a disrupted circuit. *Semin Dial*, 2009. 22(4): p. 351-6.
104. Zawada, A.M., et al., DNA methylation profiling reveals differences in the 3 human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation. *Epigenetics*, 2016. 11(4): p. 259-72.
105. Perna, A.F., et al., Homocysteine, a new crucial element in the pathogenesis of uremic cardiovascular complications. *Miner Electrolyte Metab*, 1999. 25(1-2): p. 95-9.
106. Zawada, A.M., K.S. Rogacev, and G.H. Heine, Clinical relevance of epigenetic dysregulation in chronic kidney disease-associated cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. 28(7): p. 1663-71.
107. Bostom, A.G., et al., Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(11): p. 2554-8.
108. Malaponte, G., et al., IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. 17(11): p. 1964-70.
109. Jiang, W., et al., Sex differences in monocyte activation in systemic lupus erythematosus (SLE). *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e114589.

110. Kralova Lesna, I., et al., Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women. *Atherosclerosis*, 2015. 241(1): p. 255-8.
111. Zancan, V., et al., 17Beta-estradiol decreases nitric oxide synthase II synthesis in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 1999. 140(5): p. 2004-9.
112. Ghisletti, S., et al., 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(8): p. 2957-68.
113. Starr, J.M. and I.J. Deary, Sex differences in blood cell counts in the Lothian Birth Cohort 1921 between 79 and 87 years. *Maturitas*, 2011. 69(4): p. 373-6.
114. Al-Attar, A., et al., The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. *Mech Ageing Dev*, 2016. 156: p. 25-33.
115. Moura, A., et al., Effect of Aging in the Perception of Health-Related Quality of Life in End-Stage Renal Disease Patients under Online-Hemodiafiltration. *Aging Dis*, 2015. 6(1): p. 17-26.
116. Dimkovic, N., et al., Achievement of guideline targets in elderly patients on hemodialysis: a multicenter study. *Int Urol Nephrol*, 2015. 47(9): p. 1555-63.
117. Naylor, M., et al., Cardiovascular Health Status and Incidence of Heart Failure in the Framingham Offspring Study. *Circ Heart Fail*, 2016. 9(1): p. e002416.
118. Foley, R.N., Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *J Ren Care*, 2010. 36 Suppl 1: p. 4-8.
119. Gansevoort, R.T., et al., Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 2013. 382(9889): p. 339-52.
120. Schouten, W.E., et al., Monocyte activation in peripheral blood and dialyser eluates: phenotypic profile and cytokine release. *Nephron*, 2002. 91(4): p. 646-53.
121. Castiglione, A., et al., Flow cytometric analysis of leukocytes eluted from haemodialysers. *Nephrol Dial Transplant*, 1991. 6 Suppl 2: p. 31-5.
122. Stach, K., et al., Elevation of Platelet and Monocyte Activity Markers of Atherosclerosis in Haemodialysis Patients Compared to Peritoneal Dialysis Patients. *Mediators Inflamm*, 2017. 2017: p. 8506072.
123. Hu, Z., et al., Impact of arteriovenous fistula blood flow on serum il-6, cardiovascular events and death: An ambispective cohort analysis of 64 Chinese hemodialysis patients. *PLoS One*, 2017. 12(3): p. e0172490.
124. Marshall, M.R., et al., Intensive Hemodialysis and Mortality Risk in Australian and New Zealand Populations. *Am J Kidney Dis*, 2016. 67(4): p. 617-28.
125. de Roij van Zuijdewijn, C.L., et al., Treatment Time or Convection Volume in HDF: What Drives the Reduced Mortality Risk? *Blood Purif*, 2015. 40(1): p. 53-8.
126. Beck, W., et al., Treatment frequency and efficiency in hemodiafiltration. *Blood Purif*, 2013. 35(1-3): p. 224-9.
127. Tattersall, J.E., et al., The post-hemodialysis rebound: predicting and quantifying its effect on Kt/V. *Kidney Int*, 1996. 50(6): p. 2094-102.
128. de Mutsert, R., et al., Association between body mass index and mortality is similar in the hemodialysis population and the general population at high age and equal duration of follow-up. *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(3): p. 967-74.
129. Cabezas-Rodriguez, I., et al., Influence of body mass index on the association of weight changes with mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013. 8(10): p. 1725-33.
130. Stenvinkel, P., et al., Inflammation Modifies the Paradoxical Association between Body Mass Index and Mortality in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*, 2016. 27(5): p. 1479-86.
131. Ekart, R. and R. Hojs, Obese and diabetic patients with end-stage renal disease: Peritoneal dialysis or hemodialysis? *Eur J Intern Med*, 2016.
132. Rogacev, K.S., et al., CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012. 60(16): p. 1512-1520.

133. Wrigley, B.J., et al., CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes in patients with acute ischaemic heart failure. *Eur J Clin Invest*, 2013. 43(2): p. 121-30.
134. Kawanaka, N., et al., CD14⁺CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(10): p. 2578-86.
135. Iwahashi, M., et al., Expression of Toll-like receptor 2 on CD16⁺ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(5): p. 1457-67.
136. Olsson, J., et al., Monocyte and neutrophil chemotactic activity at the site of interstitial inflammation in patients on high-flux hemodialysis or hemodiafiltration. *Blood Purif*, 2009. 28(1): p. 47-52.
137. Kim, H.W., et al., Microinflammation in hemodialysis patients is associated with increased CD14CD16(+) pro-inflammatory monocytes: possible modification by on-line hemodiafiltration. *Blood Purif*, 2011. 31(4): p. 281-8.
138. Arena, A., et al., Impaired antiviral activity of monocytes from patients on hemodiafiltration. *J Nephrol*, 2007. 20(5): p. 560-7.
139. den Hoedt, C.H., et al., Online hemodiafiltration reduces systemic inflammation compared to low-flux hemodialysis. *Kidney Int*, 2014. 86(2): p. 423-32.
140. Kaiser, J.P., et al., Significant reduction of factor D and immunosuppressive complement fragment Ba by hemofiltration. *Blood Purification*, 1995. 13(6): p. 314-321.
141. Haag-Weber, M., G. Cohen, and W.H. Horl, Clinical significance of granulocyte-inhibiting proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2000. 15: p. 15-16.
142. Kaplow, L.S. and J.A. Goffinet, Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA*, 1968. 203(13): p. 1135-7.
143. Craddock, P.R., et al., Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest*, 1977. 59(5): p. 879-88.
144. Toren, M., J.A. Goffinet, and L.S. Kaplow, Pulmonary bed sequestration of neutrophils during hemodialysis. *Blood*, 1970. 36(3): p. 337-40.
145. Rogacev, K.S., et al., Haemodialysis-induced transient CD16⁺ monocytopenia and cardiovascular outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. 24(11): p. 3480-6.
146. Jabs, K., et al., Relationship between plasma S-adenosylhomocysteine concentration and glomerular filtration rate in children. *Metabolism*, 2006. 55(2): p. 252-7.
147. Loehrer, F.M., et al., Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant*, 1998. 13(3): p. 656-61.
148. Xiao, Y., et al., Increased plasma S-adenosylhomocysteine-accelerated atherosclerosis is associated with epigenetic regulation of endoplasmic reticulum stress in apoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. 35(1): p. 60-70.
149. Wagner, C. and M.J. Koury, Plasma S-adenosylhomocysteine versus homocysteine as a marker for vascular disease. *J Nutr*, 2008. 138(5): p. 980; author reply 981.
150. Zhang, H., et al., Ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine as a sensitive indicator of atherosclerosis. *Mol Med Rep*, 2016.
151. Yang, J., et al., Chronic Kidney Disease Induces Inflammatory CD40⁺ Monocyte Differentiation via Homocysteine Elevation and DNA Hypomethylation. *Circ Res*, 2016. 119(11): p. 1226-1241.
152. McCully, K.S., Homocysteine and the pathogenesis of atherosclerosis. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2015. 8(2): p. 211-9.
153. Magott, M., [Homocysteine as a nonlipid factor in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw*, 1998. 52(3): p. 259-67.
154. Cohen, E., et al., Assessment of a possible link between hyperhomocysteinemia and hyperuricemia. *J Investig Med*, 2015. 63(3): p. 534-8.
155. House, J.D., M.E. Brosnan, and J.T. Brosnan, Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J*, 1997. 328 (Pt 1): p. 287-92.

156. Olas, B., Hydrogen Sulfide as a "Double-Faced" Compound: One with Pro- and Antioxidant Effect. *Adv Clin Chem*, 2017. 78: p. 187-196.
157. Aminzadeh, M.A. and N.D. Vaziri, Downregulation of the renal and hepatic hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and capacity in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. 27(2): p. 498-504.
158. Nigwekar, S.U., et al., Interventions for lowering plasma homocysteine levels in dialysis patients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. 5: p. CD004683.
159. Obeid, R., et al., Response of homocysteine, cystathionine, and methylmalonic acid to vitamin treatment in dialysis patients. *Clin Chem*, 2005. 51(1): p. 196-201.
160. Bostom, A.G., et al., Homocysteine-lowering and cardiovascular disease outcomes in kidney transplant recipients: primary results from the Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation trial. *Circulation*, 2011. 123(16): p. 1763-70.
161. Wang, X., et al., Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet*, 2007. 369(9576): p. 1876-82.
162. Bazzano, L.A., et al., Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*, 2006. 296(22): p. 2720-6.
163. Li, Y., et al., Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*, 2016. 5(8).
164. Bansal, N., et al., Absolute Rates of Heart Failure, Coronary Heart Disease, and Stroke in Chronic Kidney Disease: An Analysis of 3 Community-Based Cohort Studies. *JAMA Cardiol*, 2017. 2(3): p. 314-318.
165. Xu, X., et al., Efficacy of Folic Acid Therapy on the Progression of Chronic Kidney Disease: The Renal Substudy of the China Stroke Primary Prevention Trial. *JAMA Intern Med*, 2016. 176(10): p. 1443-1450.
166. Marti-Carvajal, A.J., et al., Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017. 8: p. CD006612.
167. Becker, A., et al., S-adenosylhomocysteine and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine are not related to folate, cobalamin and vitamin B₆ concentrations. *Eur J Clin Invest*, 2003. 33(1): p. 17-25.
168. Loscalzo, J., Homocysteine trials--clear outcomes for complex reasons. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1629-32.
169. Badiou, S., et al., Does hemodiafiltration improve the removal of homocysteine? *Hemodial Int*, 2011. 15(4): p. 515-21.
170. Bammens, B., et al., Removal of the protein-bound solute p-cresol by convective transport: a randomized crossover study. *Am J Kidney Dis*, 2004. 44(2): p. 278-85.
171. Weng, C.H., et al., Association Between Hemodiafiltration and Hypoalbuminemia in Middle-Age Hemodialysis Patients. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(15): p. e3334.
172. Abad, S., et al., Protein-bound toxins: added value in their removal with high convective volumes. *Nefrologia*, 2016. 36(6): p. 637-642.
173. Lin, C.L., et al., Long-term on-line hemodiafiltration reduces predialysis beta-2-microglobulin levels in chronic hemodialysis patients. *Blood Purif*, 2001. 19(3): p. 301-7.
174. Lornoy, W., et al., Remarkable removal of beta-2-microglobulin by on-line hemodiafiltration. *Am J Nephrol*, 1998. 18(2): p. 105-8.
175. Schiffli, H., B. D'Agostini, and E. Held, Removal of beta 2-microglobulin by hemodialysis and hemofiltration: a four year follow up. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 1992. 20(5): p. 1223-32.
176. Brown, L.J., et al., Using S-adenosyl-L-homocysteine capture compounds to characterize S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine binding proteins. *Anal Biochem*, 2014. 467: p. 14-21.
177. Fonlupt, P., et al., Solubilization and partial purification of S-adenosyl-L-homocysteine binding proteins from the rat brain. *Membr Biochem*, 1987. 7(4): p. 219-30.

178. Lenz, T., et al., Profiling of methyltransferases and other S-Adenosyl-L-homocysteine-binding proteins by Capture Compound mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 2012. 803: p. 97-125.
179. Kirsch, S.H., et al., Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009. 877(30): p. 3865-70.
180. Itoh, Y., et al., Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem*, 2012. 403(7): p. 1841-50.
181. Meert, N., et al., Prospective evaluation of the change of predialysis protein-bound uremic solute concentration with postdilution online hemodiafiltration. *Artif Organs*, 2010. 34(7): p. 580-5.
182. Esse, R., et al., Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e55483.
183. Ting, A.H., K.M. McGarvey, and S.B. Baylin, The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev*, 2006. 20(23): p. 3215-31.
184. Issa, J.P., CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 249: p. 101-18.
185. Wang, X., et al., Genome-wide DNA methylation patterns in coronary heart disease. *Herz*, 2017.
186. Hsu, C.Y., et al., Global DNA methylation not increased in chronic hemodialysis patients: a case-control study. *Ren Fail*, 2012. 34(10): p. 1195-9.
187. Stenvinkel, P., et al., Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med*, 2007. 261(5): p. 488-99.
188. Kato, S., et al., DNA hypermethylation and inflammatory markers in incident Japanese dialysis patients. *Nephron Extra*, 2012. 2(1): p. 159-68.
189. Ghigolea, A.B., R.A. Moldovan, and M. Gherman-Caprioara, DNA methylation: hemodialysis versus hemodiafiltration. *Ther Apher Dial*, 2015. 19(2): p. 119-24.
190. Zawada, A.M., et al., SuperTAG methylation-specific digital karyotyping reveals uremia-induced epigenetic dysregulation of atherosclerosis-related genes. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012. 5(6): p. 611-20.
191. Reilly, R.F., Attending rounds: A patient with intradialytic hypotension. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014. 9(4): p. 798-803.
192. Rocha, A., et al., Frequency of intradialytic hypotensive episodes: old problem, new insights. *J Am Soc Hypertens*, 2015. 9(10): p. 763-8.
193. Flythe, J.E., et al., Association of intradialytic blood pressure variability with increased all-cause and cardiovascular mortality in patients treated with long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 2013. 61(6): p. 966-74.
194. Park, J., et al., A comparative effectiveness research study of the change in blood pressure during hemodialysis treatment and survival. *Kidney Int*, 2013. 84(4): p. 795-802.
195. Stefansson, B.V., et al., Intradialytic hypotension and risk of cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014. 9(12): p. 2124-32.
196. Fine, A. and B. Penner, The protective effect of cool dialysate is dependent on patients' predialysis temperature. *Am J Kidney Dis*, 1996. 28(2): p. 262-5.
197. Pereira, B.J., et al., Transfer of cytokine-inducing bacterial products across hemodialyzer membranes in the presence of plasma or whole blood. *Clin Nephrol*, 1996. 46(6): p. 394-401.
198. Rosales, L.M., et al., Isothermic hemodialysis and ultrafiltration. *Am J Kidney Dis*, 2000. 36(2): p. 353-61.
199. van der Sande, F.M., et al., Thermal effects and blood pressure response during postdilution hemodiafiltration and hemodialysis: the effect of amount of replacement fluid and dialysate temperature. *J Am Soc Nephrol*, 2001. 12(9): p. 1916-20.

200. van der Sande, F.M., et al., The hemodynamic effect of different ultrafiltration rates in patients with cardiac failure and patients without cardiac failure: comparison between isolated ultrafiltration and ultrafiltration with dialysis. *Clin Nephrol*, 1998. 50(5): p. 301-8.
201. Wehle, B., et al., Hemodynamic changes during sequential ultrafiltration and dialysis. *Kidney Int*, 1979. 15(4): p. 411-8.
202. Pedrini, L.A., et al., Sodium modeling in hemodiafiltration. *Kidney Int*, 1991. 40(3): p. 525-32.
203. Donauer, J., et al., Reduction of hypotensive side effects during online-haemodiafiltration and low temperature haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003. 18(8): p. 1616-1622.
204. Locatelli, F., et al., Hemofiltration and Hemodiafiltration Reduce Intradialytic Hypotension in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010. 21(10): p. 1798-1807.
205. Tsuchida, K. and J. Minakuchi, Clinical benefits of predilution on-line hemodiafiltration. *Blood Purif*, 2013. 35 Suppl 1: p. 18-22.
206. Maduell, F., et al., Mid-dilution hemodiafiltration: a comparison with pre- and postdilution modes using the same polyphenylene membrane. *Blood Purif*, 2009. 28(3): p. 268-74.
207. Krieter, D.H., et al., Mid-dilution on-line haemodiafiltration in a standard dialyser configuration. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. 20(1): p. 155-60.
208. Krieter, D.H., et al., Clinical cross-over comparison of mid-dilution hemodiafiltration using a novel dialyzer concept and post-dilution hemodiafiltration. *Kidney Int*, 2005. 67(1): p. 349-56.
209. Ariza, F., et al., Post-dilution high convective transport improves microinflammation and endothelial dysfunction independently of the technique. *Blood Purif*, 2013. 35(4): p. 270-8.
210. Davenport, A., 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): p. 193-9.
211. Ueland, P.M., et al., Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*, 1993. 39(9): p. 1764-79.
212. Bartl, J., et al., Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria. *Clin Chim Acta*, 2014. 437: p. 211-7.
213. Lendinez, A.M., et al., Differential behavior of serum and red blood cell folate during a treatment with levofolinic acid. Gender differences. *Clin Lab*, 2014. 60(9): p. 1579-84.
214. Smith, D.E., et al., Folic acid supplementation does not reduce intracellular homocysteine, and may disturb intracellular one-carbon metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 2013. 51(8): p. 1643-50.
215. Yu, X., W. Ling, and M. Mi, Relationship of impairment induced by intracellular S-adenosylhomocysteine accumulation with DNA methylation in human umbilical vein endothelial cells treated with 3-deazaadenosine. *Int J Exp Pathol*, 2009. 90(6): p. 638-48.
216. Castro, R., et al., Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med (Berl)*, 2005. 83(10): p. 831-6.
217. Locatelli, F., L. Del Vecchio, and V. La Milia, Haemodiafiltration at Higher Volumes and Patient Survival. *Contrib Nephrol*, 2017. 189: p. 1-8.
218. Nube, M.J., et al., Mortality reduction by post-dilution online-haemodiafiltration: a cause-specific analysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2017. 32(3): p. 548-555.
219. Masakane, I., K. Kikuchi, and H. Kawanishi, Evidence for the Clinical Advantages of Predilution On-Line Hemodiafiltration. *Contrib Nephrol*, 2017. 189: p. 17-23.
220. Nistor, I., et al., Haemodiafiltration, haemofiltration and haemodialysis for end-stage kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(5): p. CD006258.
221. Ziegler-Heitbrock, L., Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 423.
222. Weber, C., et al., Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. Joint consensus document of the European Society of Cardiology (ESC) Working Groups

- "Atherosclerosis & Vascular Biology" and "Thrombosis". *Thromb Haemost*, 2016. 116(4): p. 626-37.
223. Jiang, Y., et al., Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007. 39(9): p. 657-67.

7. Publikation/Posterpräsentationen

7.1 Publikation

Zawada AM, Schneider JS, Michel AI, Rogacev KS, Hummel B, Krezdorn N, Muller S, Rotter B, Winter P, Obeid R, Geisel J, Fliser D, Heine GH.

DNA methylation profiling reveals differences in the three human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation.

Epigenetics. 2016;11(4):259-272. Impact Punkte: 4,8

7.2 Posterpräsentationen

Kongress für Nephrologie 2016 - 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

10. - 13. September 2016 Berlin

Online-Hämofiltration eliminiert Plasma-S-Adenosylhomocystein effektiver als die bisherige Standard-Hämodialysebehandlung

Insa E. Emrich, Adam M. Zawada, Anne I. Michel, Sarah Seiler-Mußler, Kai van Bentum, Reiner Boßlet, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine

53. ERA-EDTA Congress

21. - 24. Mai 2016 Wien

Online-Hemodiafiltration eliminates S-Adenosylhomocysteine more efficiently than standard Hemodialysis

Adam M. Zawada, Anne I. Michel, Insa E. Emrich, Sarah Seiler-Mußler, Kai van Bentum, Reiner Boßlet, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine

52. ERA-EDTA Congress

28. - 31. Mai 2015 London

Intermediate monocytes are predictors of cardiovascular but not of renal events

Adam M. Zawada, Anne I. Michel, Kyrill S. Rogacev, Sarah Seiler, Insa E. Emrich, Kathrin Untersteller, Claudia S. Lennartz, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine

59. Jahreskongress der Saarland Pfälzischen Internisten Gesellschaft (SPIG)

05.-07. März 2015 Neustadt an der Weinstraße

Charakterisierung von Monozytensubpopulationen als Prognosemarker für kardiovaskuläre und renale Ereignisse

Anne I. Michel, Adam M. Zawada, Kyrill S. Rogacev, Sarah Seiler, Insa E. Emrich, Kathrin Untersteller, Claudia S. Lennartz, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine

6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

06. – 09. September 2014 Berlin

Intermediäre Monozyten als Prognosemarker für kardiovaskuläre und renale Ereignisse

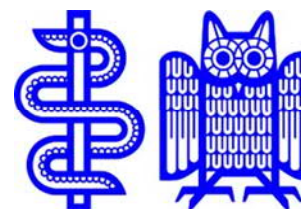
Anne I. Michel, Adam M. Zawada, Kyrill S. Rogacev, Sarah Seiler, Insa E. Emrich, Kathrin Untersteller, Claudia S. Lennartz, Danilo Fliser, Gunnar H. Heine

8. Anhang

8.1 Einverständniserklärung

UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES

Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Direktor: Prof. Dr. med. D. Fliser



Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes, D-66421 Homburg

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

im Rahmen Ihrer Dialysetherapie in unseren Abteilungen laden wir Sie ein, an einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Entzündungsparametern im Blut, Gefäßverkalkung (Atherosklerose) und chronischer Nierenerkrankung teilzunehmen.

Hierzu benötigen wir Ihre Erlaubnis, eine Blutprobe (20 ml) für Laboruntersuchungen zu verwenden. Mittels der Blutprobe möchten wir einzelne Entzündungszellen und ihre Regulationsmechanismen untersuchen. Hierbei werden Marker der Aktivierung von Entzündungsgenen untersucht, nicht jedoch die Entzündungsgene selbst.

Zusätzlich möchten wir Sie bitten, einen standardisierten Fragebogen zu Risikofaktoren und klinischen Zeichen einer Herz-Kreislaufkrankung durchzuführen. Der Zeitaufwand für diesen Fragebogen beträgt etwa 10 Minuten.

Selbstverständlich ist die Teilnahme an dieser Untersuchung für Sie freiwillig. Wenn Sie mit der Teilnahme an unserer Untersuchung nicht einverstanden sind, entstehen Ihnen keinerlei Nachteile in der medizinischen Behandlung.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen jederzeit persönlich zur Verfügung.

Prof. Dr. med. G. Heine Dr. rer. nat. A. Zawada Dr. med. K. van Bentum

Mit der Untersuchung bin ich

einverstanden

nicht einverstanden

Homburg, den _____

(Unterschrift)

Innere Medizin IV
Kirrberger Straße
66421 Homburg/Saar

Prof. Dr. D. Fliser

Sekretariat und Privatambulanz

Tel.: 06841-16-23526

Fax: 06841-16-23540

indfli@uniklinik-saarland.de

www.uniklinik-saarland.de/nephrologie

Datum:

Unser Zeichen:

Ambulanzen

Nieren- und Hochdruck-Ambulanz
Tel. 23502 Fax 23508

Transplantations-Ambulanz
Tel. 23510 Fax 23508

Peritonealdialyse-Ambulanz
Tel. 23534 Fax 23508

Risikofaktoren-Sprechstunde
Ernährung
Psychologische Beratung
Tel. 23562 Fax 23545

Diabetische Nephropathie-
Ambulanz
Tel. 23502 Fax 23508

Nierenstein-Ambulanz
Tel. 23502 Fax 23508

Funktionsdiagnostik

Duplexsonographie
Ergometrie
Tel. 23502/23509 Fax 23508

Stationen

Station M401 (Geb. 40)
Tel. 23522 Fax 23555

Station M402 (Geb. 6)
Tel. 23506 Fax 23558

Funktionsbereich Hämodialyse

M403 (Geb. 40, Zentrale)
Tel. 23503 Fax 23567

M404 Akutdialyse (Geb. 40)
Tel. 23505 Fax 23567

M405 (Geb. 40)
Tel. 23504 Fax 23567

Dialysetützpunkt (Geb. 6)
Tel. 23561 Fax 23567

Aphereseverfahren
Tel. 23505 Fax 23567

Nephrologisches Labor

Forschungslabor
Tel. 23512 Fax 23499

Urinlabor
Tel. 23535 Fax 23499

8.2 Datenschutzerklärung

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Studie folgende, freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d. h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern bei den Prüfarzten der beteiligten Klinik – Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums des Saarlandes – aufgezeichnet werden. Weiterhin erkläre ich mich einverstanden, dass im Rahmen von externen Überprüfungen wie etwa durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes Einsicht in meine Daten gewährt werden kann.
2. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen die meine personenbezogenen Daten - insbesondere Gesundheitsdaten - gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Name: _____

Datum: _____

Unterschrift: _____

8.3 Fragebogen

Proband _____ Geburtsdatum _____ Geschlecht ____ Untersuchungsdatum _____

Nummer _____

Ethnizität o weiss o Asiat
 o Afroamerikaner o _____

Körpergröße ohne Schuhe _____

Herzfrequenz _____/min

Ist der Patient seit mindestens acht Stunden nüchtern? O Nein O Ja

Komorbiditäten:

1. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?
O Ja
O Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)
2. 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.
3. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?
O Ja
O Nein
4. 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.
5. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesen Schmerzen oder diesen Beschwerden?
O Es kommt zu einer Erleichterung
O Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)
6. Wie rasch?
O Innerhalb von 10 Minuten.
O Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).
7. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

Brustbein (oberes oder mittleres Drittel)

Brustbein (unteres Drittel)

Linksseitige vordere Brustwand

Linker Arm

(alle Angaben notieren)

8. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonstwo?

Ja (Notieren wo _____)

Nein

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

Ja

Nein

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

Ja

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

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

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

Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

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

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

Ja

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

Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

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

Ja

Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

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

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 (Details notieren)
 - Nein
20. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?
- Ja (Details notieren)
 - 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 (Details notieren)
 - Nein
22. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?
- Ja (Details notieren)
 - Nein
23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?
- Ja (Details notieren)
 - Nein
24. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?
- Ja (Details notieren)
 - Nein
25. a Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?
- Ja (Details notieren)
 - Nein
- b Hatten Sie in diesem Rahmen Fieber $>38,0^{\circ}\text{C}$?
- 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 29*)
- O Nein
28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?
- _____
29. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?
- _____
30. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich in diesen Jahren 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. Leiden Sie unter Luftnot bei körperlicher Anstrengung?
- O Ja (*weiter mit Frage 36*)
- O Nein (*weiter mit Frage 38*)
36. Tritt diese Luftnot bei durchschnittlichem Gehtempo auf?
- O Ja, innerhalb der ersten 200 m

Ja, aber erst nach den ersten 200m

Nein, nicht bei durchschnittlichem Gehtempo

37. Tritt diese Luftnot bereits in Ruhe auf?

Ja

Nein

38. Wieviel Urin scheiden Sie pro Tag etwa aus?

_____ ml

8.4 Arbeitsablauf Labor

Überprüfung Einschluss- / Ausschlussfaktoren

- Schriftliches Einverständnis
- Nierenersatztherapie seit > 3 Monaten
- Drei Hämodialyse / Hämodiafiltration Behandlungen pro Woche
- Keine Konversion von Hämodiafiltration auf Hämodialyse oder von Hämodialyse auf Hämodiafiltration in den vorherigen vier Wochen
- Veränderung Dialysezeit / Blutfluss in den vorherigen 14 Tage
- Keine systemische Immunsuppression

Ablauf

- | | | |
|--|----------------------------|--------------------------|
| Blutröhrchen gerichtet | <input type="radio"/> | |
| Standardlabor vor HD angeordnet (inkl. Diff BB) | <input type="radio"/> | |
| Standardlabor nach HD angeordnet (inkl Diff BB) | <input type="radio"/> | |
| Kurzfragebogen | <input type="radio"/> | |
| „Deckblatt“ ausgedruckt | <input type="radio"/> | |
| Ist der Patient seit mindestens acht Stunden nüchtern? | <input type="radio"/> Nein | <input type="radio"/> Ja |
| Medikamentenplan ausgedruckt | <input type="radio"/> | |
| Medikamentenplan mit Patienten überprüft | <input type="radio"/> | |