

**Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie  
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**L-FABP und H-FABP als neue prognostische Biomarker für den  
Beginn einer Nierenersatztherapie im Falle eines akuten  
Nierenversagens**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Rabi Raj DATTA  
aus  
Kassel**

**Göttingen 2011**

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Dihazi

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub

3. Berichterstatter: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. T. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2012

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Niere .....	1
1.1.1 Akutes Nierenversagen (ANV) .....	1
1.1.1.1 Verlauf und Klinik des akuten Nierenversagens .....	2
1.1.1.2 Klassifikationssysteme des akuten Nierenversagens und Diagnose .....	4
1.1.1.3 Therapie des akuten Nierenversagens – Teil 1 .....	9
1.1.1.4 Therapie des akuten Nierenversagens – Teil 2 .....	10
1.2 Proteomics .....	13
1.2.1 2D-Gel-Elektrophorese in der Biomarkersuche .....	15
1.2.2 Weitere Methoden zur Biomarkersuche .....	16
<b>2 Fragestellung und Ziel der Studie</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Patienten .....	19
3.1.1 Studiendesign .....	19
3.1.2 Aufnahme der Patienten .....	19
3.1.2.1 Einschlusskriterien .....	19
3.1.2.2 Ausschlusskriterien .....	20
3.1.3 Studienablauf und Dokumentation .....	20
3.1.4 Einteilung der Gruppen .....	21
3.1.4.1 Nicht-Dialyse-Gruppe (ND) .....	21
3.1.4.2 Dialyse-Gruppe (D) .....	22
3.2 Material .....	22
3.2.1 Verbrauchsmaterialien .....	22
3.2.2 Chemikalien .....	23
3.2.3 Lösungen für proteinbiochemische Methoden .....	23
3.2.4 Geräte .....	24
3.2.5 Spezielle Laborparameter .....	25
3.2.6 Wissenschaftliche Software .....	26
3.3 Statistische Methoden .....	26
3.4 Proteinbiochemische experimentelle Methoden .....	27
3.4.1 Bradford Proteinbestimmung .....	27

3.4.2	Probenaufarbeitungsmethoden .....	27
3.4.2.1	Acetonfällung .....	27
3.4.2.2	Ethanol-fällung .....	28
3.4.2.3	Chlorophorm-Methanol-Extraktion .....	28
3.4.2.4	Ankonzentrierung und Entsalzung mittels Vivaspin®-Konzentratoren .....	29
3.4.3	Die Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese .....	29
3.4.3.1	Isoelektrische Fokussierung .....	29
3.4.4	Proteinelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel.....	31
3.4.5	Gelfärbungsmethoden .....	31
3.4.5.1	Silberfärbung .....	31
3.4.5.2	Kolloidale Coomassiefärbung .....	32
3.4.5.3	Flamingo®-Färbung .....	33
3.4.6	Digitalisierung der Gele .....	33
3.4.7	Statistische Auswertung der Gele.....	34
3.4.8	Massenspektrometrie.....	37
3.4.8.1	Gewinnung der Spektren .....	37
3.4.8.2	Datenbankabgleich .....	38
3.4.9	Peptid-Sequenzanalyse .....	38
3.4.10	Bestätigung der Ergebnisse via Dot Blot .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1	Patienten .....	41
4.1.1	Vorerkrankungen und Formen des akuten Nierenversagens.....	42
4.1.2	Blut- und Urinparameter .....	43
4.1.3	Logistisches Regressionsmodell .....	47
4.2	Proteinbiochemische Ergebnisse.....	50
4.2.1	Optimierungsarbeit/-ergebnisse .....	50
4.2.2	Patientenproben .....	54
4.2.3	Gelelektrophoretische Analyse des Urinproteoms .....	57
4.2.4	Bestätigung der 2D-SDS-PAGE-Ergebnisse mittels Dot Blot.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
5.1	Einteilung des akuten Nierenversagens.....	71
5.2	Neue Biomarker für das akute Nierenversagen.....	72
5.3	Ergebnisinterpretation .....	74
5.3.1	Funktion und Bedeutung der FABPs .....	74

5.3.1.1	Liver-fatty acid binding protein (L-FABP) .....	75
5.3.1.2	Heart-fatty acid binding protein (H-FABP) .....	79
5.4	Prognosemöglichkeit für den Beginn einer Nierenersatztherapie .....	80
5.4.1	Prognosefähigkeit des L-FABPs .....	80
5.4.2	Prognosefähigkeit des H-FABPs.....	82
5.4.3	Prognosefähigkeit der Formel .....	82
5.5	Methoden.....	83
5.6	Fazit.....	86
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	88
7	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	90
8	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	93
9	<b>Anhang</b> .....	106

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Niere

Die Niere ist eines der wichtigsten Organe des Menschen. Dies wird durch ihre Funktionen ersichtlich. Eine ihrer wichtigen Aufgaben besteht darin, über die Diurese Metabolite und anfallende Giftstoffe zu eliminieren. Darüber hinaus dient sie der Homöostase sowohl des Wasser- und Säure-Basen-Haushalts als auch der Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphat und Bikarbonat).

Neben diesen homöostatischen und metabolischen Funktionen besitzt die Niere endokrine Aufgaben. Sie sezerniert Renin, Erythropoetin, Calcitriol, Kinine und Prostaglandine und ist damit unter anderem mitverantwortlich für die Regulierung des Blutdrucks, der Erythropoese und die Umwandlung des Cholecalciferol in seinen aktiven Metaboliten Calcitriol.

Hierdurch wird ersichtlich, welche Konsequenzen eine Schädigung dieses Organs mit sich bringt.

Mit einem Auftreten von 5 % aller im Krankenhaus liegenden Patienten und im Speziellen 30-50 % der auf Intensivstation liegenden Patienten fällt dem akuten Nierenversagen eine besondere Rolle in diesem Zusammenhang zu (Xue et al. 2006).

### 1.1.1 Akutes Nierenversagen (ANV)

Das akute Nierenversagen ist eine komplexe Fehlstörung, die definiert ist als eine akut einsetzende, rasche Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, welche über Tage anhalten kann und im Prinzip reversibel ist. Es kann nach vorheriger normaler oder nach bereits chronisch eingeschränkter Nierenfunktion (ANV auf dem Boden einer chronischen Niereninsuffizienz) auftreten. Die Ursachen werden entsprechend dem Ursprungsort der Schädigung in prärenal, intrarenal und postrenal eingeteilt. Es wird eine Häufigkeit mit 30-60 % für das prärenale, 20-40 % für das intrarenale und 10 % für das postrenale Nierenversagen (Carmichael und Carmichael 2003) bzw. 40-80 %, 10-50 % und <10 % (Dishart und Kellum 2000) beschrieben. Die Übergänge sind häufig fließend.

Die glomeruläre und renale tubuläre Struktur ist beim prärenalen Nierenversagen anfangs vollkommen unbeschädigt. Ursächlich für den Funktionsverlust der Nieren ist eine Verminderung der Perfusion, die bedingt sein kann z.B. durch ein Herabsinken des Herzzeitvolumens, einen Abfall des zirkulierenden Blutvolumens und des arteriellen Mitteldrucks, speziell bei Schockzuständen unterschiedlicher Genese, oder eine systemische

Vasodilatation, wie sie z.B. durch eine renale Vasokonstriktion vermittelt durch das hepatorenale Syndrom oder bei einer Sepsis entsteht. Auch können verschiedene Medikamente, wie z.B. Diuretika, die Funktion der Nieren beeinflussen (Jorres und Frei 2001).

All diesen Ursachen ist gemeinsam, dass die Nierenfunktionsstörung reversibel ist, solange es zur rechtzeitigen Beseitigung der auslösenden Ursache kommt. Beim nicht rechtzeitigen Handeln besteht die Gefahr der Schädigung der Organstruktur, was zu einer akuten Tubulusnekrose und letztlich zu einem intrarenalen Nierenversagen führen kann, bei dem keine umgehende Regeneration der Tubulusepithelien folgt (Jorres und Frei 2001).

Intrarenal lassen sich die Ursachen für ein ANV in verschiedenen Bereichen der Niere finden: in der Makrozirkulation, also in den großen Gefäßen (z.B. durch Thrombose, Kompression, Atherosklerose oder eine Vaskulitis); in der Mikrozirkulation (z.B. durch Glomerulonephritis, Vaskulitis, Hypertonie, Kontrastmittel, Präeklampsie, Kollagenosen oder das hämolytisch urämische Syndrom); im tubulären Interstitium (z.B. durch interstitielle Nephritis, Infektionen oder Tumordinfiltration) oder im Tubulussystem im Sinne einer ischämischen/nephrotoxischen akuten Tubulusnekrose (z.B. hervorgerufen durch Sepsis, Schock, Antibiotika, Kontrastmittel oder Myo-/Hämoglobin) (Haller und Schelling 2000).

Die am seltensten vorkommende Variante wird durch das postrenale Nierenversagen beschrieben. Diese wird durch eine Harnabflussbehinderung verursacht. Die Obstruktion kann auf dem Weg von den Uretern über den Blasenausgang bis hin zur Urethra überall zu finden sein. Ursachen dafür können erworbene Missbildungen, maligne Tumore, gynäkologische Erkrankungen, operative Komplikationen, ein fehlerhafter Blasenkatheter oder auch bestimmte Medikamente (z.B. Anticholinergika) bei vorbestehender Abflussbehinderung (z.B. Prostataadenom) sein (Jorres und Frei 2001, Herold et al. 2011).

### ***1.1.1.1 Verlauf und Klinik des akuten Nierenversagens***

Die Bandbreite der klinischen Manifestation ist mannigfaltig und reicht von nur einem leichten Anstieg des Serumkreatinins bis hin zu einem anurischen Nierenversagen (Metnitz et al. 2002, Mehta et al. 2004, Palevsky 2006, Mehta et al. 2007).

Als Leitsymptome gelten laut Herold 2011 der Rückgang der Diurese mit Oligo-/Anurie und die Erhöhung des Serumkreatinins um mehr als 50 % des Ausgangswertes. Allerdings verlaufen bis zu 30 % der ANV normo- oder polyurisch, so dass dann der Anstieg des Serumkreatinins als einziges Leitsymptom bleibt (Herold et al. 2011).

Der Verlauf wird in drei Phasen eingeteilt. Die erste Phase ist die Initialphase, welche ohne Symptome oder durch Symptome des Grundleidens charakterisiert ist. Darauf folgt die Phase des manifesten Nierenversagens, welche durch eine anhaltende Reduzierung der glomerulären Filtrationsrate gekennzeichnet ist und eine weitere Progredienz im Anstieg der Retentionswerte zeigt. Je nach Ausscheidung wird hier ein Unterschied zwischen einem oligurischen und einem nicht oligurischen Verlauf gemacht. Die dritte Phase letztlich wird als diuretische oder polyuretische Phase bezeichnet (Herold et al. 2011)

Probleme entstehen hauptsächlich bei oligo-anurischem Nierenversagen, da es durch eine dadurch bedingte Hypervolämie zu Hypertonie, Linksherzinsuffizienz, Lungenödem, Pleuraergüssen, peripheren Ödemen und Hirnödemen kommen kann. Des Weiteren sind Störungen des Elektrolythaushalts mit Hyponatriämie, Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und Hypokalzämie wichtige nennenswerte Komplikationen. Ferner kann es neben Entgleisungen des Säure-Basen-Haushaltes mit Entwicklung einer metabolischen Azidose zu Herz-Rhythmusstörungen, einer Perikarditis und einem Perikarderguss kommen. Die Urämie kann zu weiteren Komplikationen wie einer Gastritis mit Ulcera und Blutungen, einer Anämie und einer gestörten Thrombozytenfunktion bis hin zu einer urämischen Enzephalopathie führen. Zudem besteht durch ein allgemein erhöhtes Infektionsrisiko eine erhöhte Inzidenz einer Pneumonie und Schocklunge (Herold et al. 2011).

Der Stellenwert des ANVs in der heutigen Medizin wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass ein unkompliziertes ANV nach dem akuten Myokardinfarkt und nach dem apoplektischen Insult die dritthöchsten Klinikaufenthaltskosten verursacht (Waikar et al. 2008).

Die Entwicklung eines ANVs bei intensivpflichtigen Patienten ist mit einem Anstieg der Mortalität assoziiert, besonders wenn es auf der Intensivstation entwickelt wurde (Mehta et al. 2002). Des Weiteren kann ein akutes Nierenversagen zu einem beschleunigten Voranschreiten einer schon existierenden chronischen Niereninsuffizienz bis hin zum terminalen Nierenversagen führen, was die Medizin vor immense Probleme stellt (Chertow et al. 2005, Melnikov und Molitoris 2008). Durch mehrere Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass das akute Nierenversagen ein unabhängiger Risikofaktor für die Sterblichkeit ist (Levy EM et al. 1996, Bates et al. 2001, Metnitz et al. 2002, Chertow et al. 2005, Palevsky 2007).



### ***1.1.1.2 Klassifikationssysteme des akuten Nierenversagens und Diagnose***

Trotz der Wichtigkeit des ANVs gab es lange Zeit keinen Konsens über die diagnostischen Kriterien oder die klinische Definition, was zu beinahe 35 verschiedenen Definitionen in der medizinischen Literatur führte (Kellum et al. 2002).

So wurde das akute Nierenversagen in unterschiedlichen Studien basierend auf Veränderungen des Serumkreatinins, den absoluten Wert des Serumkreatinins, Veränderungen des Blutharnstoffes oder der Urinausscheidung oder der Notwendigkeit einer Dialyse beschrieben (Mehta et al. 2007). Die vielfältigen Variationen der Definitionen haben es sehr schwierig gemacht, Informationen entlang der zahlreichen Studien und Populationen zu vergleichen (Bellomo et al. 2004a). Aus diesem Grund variieren z.B. die Inzidenzrate für das Auftreten eines ANVs bei kritisch kranken Menschen in Studien zwischen 1 und 25 % (de Mendonca et al. 2000, Srisawat et al. 2010) und die Sterblichkeitsrate zwischen 15 und 90 % (Metnitz et al. 2002, Bellomo et al. 2004b, Srisawat et al. 2010) je nachdem, welche Population untersucht und welche Kriterien zu Grunde lagen.

Die meisten Definitionen des ANVs enthalten gemeinsame Elemente, inklusive des Gebrauchs des Serumkreatinins und oft der Diurese. Trotz der zahlreichen Nierenfunktionen sind dies die einzigen Parameter, welche exklusiv der Niere zugesprochen werden können und sich einfach routinemäßig messen lassen.

Diese Parameter waren die Grundlage für die „*Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI)*“, einer internationalen Gruppe von Experten aus dem Bereich der Nephrologie und Intensivmedizin, die 2002 einen neuen Konsens und eine evidenzbasierende Definition für das akute Nierenversagen erarbeiteten. 2004 wurde diese Definition unter dem Akronym RIFLE schließlich publiziert, welcher als ein einheitlicher Standard für die Diagnose und Klassifizierung des ANVs dienen sollte (Bellomo et al. 2004b).

Der Standard definiert drei Schweregrade, welche jeweils mit den Buchstaben R für das englische Wort „*risk*“ (Risiko), I für „*injury*“ (Schädigung) und F für „*failure*“ (Versagen der Nieren), sowie zwei Outcome-Kategorien, nämlich L für „*loss of kidney function*“ (Verlust der Nierenfunktion) und E für „*end-stage kidney disease*“ (Terminales Nierenversagen) bezeichnet werden. Dieses Klassifikationssystem enthält separate Kriterien für das Kreatinin und die Urinausscheidung. Ein Patient kann die Kriterien entweder durch Änderungen des Serumkreatininwertes oder eine Änderung der Diurese oder beides gleichzeitig erfüllen. Das Kriterium, welches zur am schlechtesten möglichen Klassifizierung führt, sollte benutzt werden (Lopes et al. 2008). Die einzelnen Stadien werden in der folgenden Tabelle 1 erläutert.

**Tabelle 1:** RIFLE-Klassifikation

Stadium	GFR Kriterium	Urinausscheidung
<b>Risk</b>	1,5facher Kreatininanstieg <i>oder</i> ein GFR-Abfall > 25 %	< 0,5 ml/kg/h über 6 h
<b>Injury</b>	2facher Kreatininanstieg <i>oder</i> ein GFR-Abfall > 50 %	< 0,5 ml/kg/h über 12h
<b>Failure</b>	3facher Kreatininanstieg <i>oder</i> Serumkreatininwert $\geq$ 4mg/dl mit einem akuten Anstieg > 0,5 mg/dl <i>oder</i> ein GFR-Abfall > 75 %	< 0,3 ml/kg/h über 24 h <i>oder</i> Anurie über 12 h
<b>Loss</b>	Persistierendes ANV = kompletter Verlust der Nierenfunktion > 4 Wochen	
<b>End-stage kidney disease</b>	Terminales Nierenversagen > 3 Monate	

Die Patienten werden über das Serumkreatinin, die Urinausscheidung oder beide zusammen kategorisiert, wobei die Kategorie benutzt wird, die zur schlechtesten Kategorie führt. Die Glomeruläre Filtrationsrate wird berechnet als ein Anstieg der Serumkreatinins vom Baseline-Kreatininwert. Wenn der Grundwert des Kreatinins unbekannt und keine chronische Nierenerkrankung aus der Vergangenheit bekannt ist, wird das Serumkreatinin mit Hilfe der modifizierten Formel „*Diet in Renal Disease formula for assessment of kidney function*“ (Manjunath et al. 2001) berechnet, wobei man von einer GFR von 75 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> ausgeht.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wird, benutzt man einen Grundwert für den Serumkreatininwert, um diesen als Ausgangspunkt für die Berechnung des Anstiegs dieses Parameters zu benutzen. Bei Patienten, bei denen dieser Wert nicht bekannt ist und keine chronische Nierenerkrankung in der Vorgeschichte beschrieben ist, wird das Serumkreatinin mit Hilfe der modifizierten Formel „*Diet in Renal Disease formula for assessment of kidney function*“ (Manjunath et al. 2001) berechnet, wobei man von einer GFR von 75 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> ausgeht. Diese Formel bietet eine gute Schätzung des GFR relativ gesehen zum Serumkreatinin basierend auf Alter, Rasse und Geschlecht.

Zusätzlich zu den drei Stadien zur Klassifizierung der renalen Dysfunktion besitzt die RIFLE-Klassifikation, wie bereits erwähnt, zwei Stadien zur Charakterisierung zweier Outcome-Klassen: L für den persistierenden Verlust der Nierenfunktion und E für die terminale Niereninsuffizienz.

Das persistierende Nierenversagen ist definiert als Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie für mehr als vier Wochen, wohingegen die terminale Niereninsuffizienz definiert wird durch die Dialysepflichtigkeit über mehr als vier Monate (Bellomo et al. 2004b).

Viele Studien haben gezeigt, dass die RIFLE-Kriterien eine klinische Relevanz haben für die Diagnose, Klassifizierung des Schweregrads und das Monitoring des Fortschreitens des akuten Nierenversagens und genauso eine Vorhersage der Mortalität bei Hospitalisierten im Allgemeinen und Patienten auf der Intensivstation im Einzelnen möglich machen (Lopes et al. 2008). Hierzu gibt es Hinweise, dass ein Anstieg des Schweregrades des ANVs, eingeteilt durch die RIFLE-Klassifikation, direkt assoziiert ist mit einer höheren Mortalität (Bellomo et al. 2004b, Hoste et al. 2006, Hoste und Kellum 2007, Bagshaw et al. 2008b).

Nichtsdestotrotz wurde seitdem durch mehrere Forschungsberichte gezeigt, dass bereits kleinere Veränderungen des Serumkreatinins als die, welche in den RIFLE-Kriterien benannt werden, möglicherweise mit einem ungünstigeren Outcome assoziiert sind (Gruberg et al. 2000, Lassnigg et al. 2004, Chertow et al. 2005, Levy MM et al. 2005, McCullough und Soman 2005, Praught und Shlipak 2005). So berichten einige Studien über eine deutliche Zunahme der Mortalität bei einem Kreatininsanstieg von nur 0,3 mg/dl (Chertow et al. 2005). Aus diesem Grund wurden die RIFLE-Kriterien 2007 von der „*Acute Kidney Injury Network*“ (AKIN), einer multi-disziplinären internationalen Gruppe, modifiziert (Mehta et al. 2007). Diese Modifikationen können wie folgt zusammengefasst werden: Erweiterung der R („*Risk*“) – Kategorie um einen Anstieg des Serumkreatinins um 0,3 mg/dl, auch wenn der Anstieg nicht einen um 50 % größeren Wert als den Grundwert erreicht; Einsetzen eines 48 h-Fensters ab dem Zeitpunkt der ersten Dokumentation von Parametern eines Patienten; Kategorisierung eines Patienten unter F („*Failure*“), wenn dieser mit einer NET behandelt wurde unabhängig vom Kreatininwert oder der Diuresemenge, die die Patienten zu Beginn der NET hatten (Mehta et al. 2007).

Außerdem benutzt die AKIN-Klassifikation die Bezeichnung „1, 2 und 3“ für ihre Stadien anstatt R, I und F (Srisawat et al. 2010). Daneben wurden die Outcome-Kriterien L für „*loss of kidney function*“ (Verlust der Nierenfunktion) und E für „*end-stage kidney disease*“ (Terminales Nierenversagen) aus der Klassifikation entfernt. Die einzelnen Stadien werden in Tabelle 2 zusammenfassend gezeigt:

**Tabelle 2:** AKIN-Klassifikation

Stadium	GFR Kriterium	Urinausscheidung
1	Anstieg des Serumkreatinins $\geq 0,3$ mg/dl <i>oder</i> ein 1,5 bis 2facher Kreatininanstieg	$< 0,5$ ml/kg/h über 6 h
2	2 bis 3facher Kreatininanstieg	$< 0,5$ ml/kg/h über 12 h
3	$> 3$ facher Kreatininanstieg <i>oder</i> Serumkreatininwert $\geq 4$ mg/dl mit einem akuten Anstieg $> 0,5$ mg/dl	$< 0,3$ ml/kg/h für 24 h <i>oder</i> Anurie für 12 h

Das akute Nierenversagen wird definiert als eine plötzliche (innerhalb von 48 h) Verminderung der Nierenfunktion, welche zur Zeit als eine absolute Steigerung des Serumkreatinins  $\geq 0,3$  mg/dl definiert ist, eine prozentuale Steigerung des Serumkreatinins  $\geq 50$  % (1,5fache des Grundwertes) oder Reduktion der Diurese (dokumentierte Oligurie  $< 0,5$  ml/kg/h für über 6h). Patienten, die eine NET erhalten haben, werden dem Stadium 3 zugeteilt unabhängig vom Stadium, in dem sie sich zur Zeit der NET befunden hätten (Lopes et al. 2008).

Das Ziel, eine Standardisierung für eine der am häufigsten auftretenden Komplikationen auf der Intensivstation zu schaffen, scheint mit der RIFLE-Klassifikation realisiert worden zu sein (Kellum 2008). Welche der beiden Klassifizierungen (RIFLE und AKIN) sich schließlich durchsetzen wird, müssen weitere neben den bereits bestehenden Veröffentlichungen (Lopes et al. 2008, Bagshaw et al. 2008a) zeigen.

Neben diesen Klassifikationen gibt es weitere Möglichkeiten, ein akutes Nierenversagen zu charakterisieren.

Als Grundlage jeglicher Diagnostik muss eine ausführliche Anamnese des Patienten mit Aufzeichnung seiner Klinik und Diuresemenge erfolgen. Dazu müssen sowohl Urin- (Status, Sediment und Akanthozyten) als auch Blutparameter (Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Kalium, Kalzium, Blutgase, Blutbild, CK, LDH, Lipase, Elektrophorese und Blutkultur) standardmäßig bestimmt werden, um mögliche Ursachen des akuten Nierenversagens zu ermitteln (Herold et. al 2011). Daneben kann die Funktionsfähigkeit der Tubuli einerseits durch die Natriumrückresorption anhand der fraktionellen Natriumexkretion, andererseits durch die Konzentrationsfähigkeit mittels Urin- und Serumosmolalität geschätzt und dadurch versucht werden, zwischen einem prä- und intrarenalen ANV zu unterscheiden. Beide Parameter zeigen den Vorteil, dass zur Bestimmung dieser Werte kein Sammelurin nötig ist, zeigen allerdings den Nachteil, von intensivmedizinischen Maßnahmen (z.B. Flüssigkeits-/ Elektrolytsubstitution oder Diuretikagabe) (Haller und Schelling 2000). Hier zeigt die Messung der fraktionellen Harnstoffextraktionsrate den Vorteil, dass die

Harnstoffkonzentration nur gering mit der Gabe von Diuretika interagiert. Zusätzlich kann diese hilfreich sein, ein Volumendefizit zu erkennen. So liegt bei einer fraktionellen Harnstoffexkretion kleiner als 35 % mit hoher Wahrscheinlichkeit ein prärenales Nierenversagen, bei einer Exkretion größer 35 % ein intrarenales Nierenversagen vor (Connors et al. 1996). Abbildung 1 und Tabelle 3 fassen die gemachten Angaben noch einmal zusammen.

$$\text{Fraktionelle Exkretion Na} = \frac{(\text{Urin} - \text{Na} \times \text{Serum} - \text{Krea})}{(\text{Serum} - \text{Na} \times \text{Urin} - \text{Krea})} \times 100$$

$$\text{Fraktionelle Exkretion Harnstoff} = \frac{(\text{Urin} - \text{Harnstoff} \times \text{Serum} - \text{Krea})}{(\text{Serum} - \text{Harnstoff} \times \text{Urin} - \text{Krea})} \times 100$$

**Abbildung 1:** Bestimmungsformel für die fraktionelle Natrium- (obere Formel) und Harnstoffsekretion (untere Formel), um die tubuläre Funktionsfähigkeit zu beurteilen und daraus zwischen einem prä- und intrarenalen Nierenversagen zu unterscheiden.

**Tabelle 3:** Unterscheidungskriterium für das prä- und intrarenale akute Nierenversagen

	Urin-Natrium (mmol/l)	Urin-/Serumosmolalität (mosm/kg)	Fraktionelle Na-Exkretion ( % )
Prärenales ANV	< 10	> 1,1	< 1
Intrarenales ANV	30-90	0,9 -1,05	>1

Durch das Urin-Natrium, die Urin-/Serumosmolalität und die fraktionelle Na-Exkretion kann versucht werden, zwischen prärenalem und intrarenalem ANV zu unterscheiden. Dies beruht auf der Annahme, dass bei einem prärenalen Schaden die glomeruläre Filtrationsrate zwar limitiert ist, die Tubuli jedoch noch intakt sind. Bei einem prärenalen ANV wird dadurch ein eher konzentrierter Urin mit niedrigem Natriumgehalt ausgeschieden, bei tubulärer Nekrose (intrarenalem ANV) auf Grund von mangelnder Wiederaufnahme von Wasser und Natrium ein eher verdünnter Urin mit einem großen Natriumanteil (Herold et al. 2011).

Bei allen messbaren Nierenwerten ist zu bedenken, dass sie grundsätzlich Schwankungen unterliegen (Haller und Schelling 2000).

Zusätzlich ist es möglich, bildgebende Verfahren zur Diagnostik zu verwenden. Hier sind im Einzelnen die Sonografie, z.B. bei Verdacht auf Nierenbeckenstau oder großen Nieren bei ANV, die farbkodierte Duplexsonografie bei fraglichen arteriellen oder venösen Perfusionsstörungen, oder ferner eine Angio-MRT bei Hinweisen auf eine Nierengefäßthrombose bzw. Angio-CT zur besseren Darstellung von Stenosen in der Urinabflussbahn zu nennen. Des Weiteren ist es möglich, Harnsediment (z.B. Erythrozyten und Erythrozytenzylinder) zu bestimmen und immunologische Zusatzuntersuchungen z.B. nach Antibasalmembran-Ak, ANCA, ANA, Komplementfaktoren etc. durchzuführen, um eine

eventuelle renoparenchymale Grunderkrankung zu diagnostizieren (Druml 2007, Herold et al. 2011).

Letzten Endes ist eine Nierenbiopsie unter anderem indiziert bei einem Verdacht auf ein akutes Nierenversagen, welches durch eine rasch progrediente Glomerulonephritis bedingt ist (Herold et al. 2011).

Es bleibt zu hoffen, dass der Gebrauch der funktionellen Marker (Diurese und Serum-Kreatinin) in naher Zukunft durch andere Biomarker ersetzt oder erweitert wird (Kellum 2008), da die Aussagekraft jener beiden Parameter zur frühen Diagnosestellung eines ANVs in Frage gestellt werden kann. So kann die Diuresemenge z.B. durch Diuretika leicht verfälscht werden. Kreatinin hat den großen Nachteil, dass es im Serum erst dann ansteigt, wenn die glomeruläre Filtration um mehr als die Hälfte vermindert ist, weswegen sich Kreatinin nicht besonders gut für die Früherkennung eines akuten Nierenversagens eignet (Keller 1991).

Einige neue potentielle Serum- und Urinmarker zum frühen Diagnostizieren eines ANVs wurden bereits identifiziert, wie z.B. das NGAL (Mishra et al. 2005), KIM-1 (Han et al. 2002), Cystatin C (Ahlstrom et al. 2004) oder das Interleukin-18 im Urin (Parikh et al. 2004, Parikh et al. 2005), welche zur Etablierung allerdings noch weiterer Forschung bedürfen.

### ***1.1.1.3 Therapie des akuten Nierenversagens – Teil 1***

Das ANV, sei es nun renal oder extrarenal bedingt, kann einzig durch die Therapie der führenden Grunderkrankung behandelt werden (Haller und Schelling 2000). Folglich muss man z.B. nephrotoxische Medikamente entweder in ihrer Dosis der schlechteren Nierenfunktion wegen anpassen oder ganz absetzen. Bei renovaskulären Verschlusskrankungen ist es nötig, Maßnahmen zur Revaskularisation durchzuführen. Beim postrenalen ANV ist es wichtig, eventuelle Stenosen der Harnleiter bzw. -röhre mittels Blasenkatheter oder operativ zu beseitigen. Ebenso ist eine optimale Schocktherapie wichtig. Als Beispiele dafür seien bei z.B. einem septischen Schock eine frühe, angemessene antibiotische Therapie oder chirurgische Herdsanierung zu nennen (Haller und Schelling 2000, Herold et al. 2011).

Das prä- und postrenale ANV sollte, wenn möglich, durch eine ursächliche Therapie schnellstmöglich behandelt werden, da ansonsten ein Übergehen in ein intrinsisches ANV droht (Abernethy und Lieberthal 2002). Zudem ist das prä- bzw. postrenale Nierenversagen symptomatisch zu therapieren, was unter anderem eine Flüssigkeits- und

Elektrolytbilanzierung und eine an den Flüssigkeitsverlust angepasste Flüssigkeitssubstitution beinhaltet.

Die Aufrechterhaltung eines ausreichend hohen arteriellen Mitteldrucks, welcher nicht unter 65 mmHg fallen sollte, ist für die glomeruläre Filtration essentiell. Kann der arterielle Mitteldruck nicht ausreichend durch eine alleinige Volumentherapie gehalten werden, ist der Einsatz von Katecholaminen indiziert. So sollte beispielsweise bei einem kardial bedingten Low-output-Syndrom Dobutamin verwendet werden, bei septischen Patienten Noradrenalin, das bei suffizienter Volumensubstitution zu einer Normalisierung des pathologisch erniedrigten Gefäßtonus und so zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führen kann (Albanese et al. 2004). Ferner ist auf eine genügend hohe Kalorienzufuhr (ca. 40 kcal/kg) zu achten (Herold et al. 2011).

Beim oligurischen ANV wird versucht, die Aufrechterhaltung der Diurese durch Diuretikagabe (besonders Schleifendiuretika) sicherzustellen (Herold et al. 2011). Allerdings wird der unkontrollierte und hohe Einsatz von Diuretika in der Intensivmedizin zusehends kritisch bewertet. So wird die Diurese zwar gesteigert, die glomeruläre Filtrationsrate allerdings nicht, so dass bei ausbleibendem Diureseanstieg ein Fortführen dieser Medikation nicht sinnvoll ist. Durch Diuretikagabe kann ein ANV nicht verhindert werden. Vielmehr beschreiben einige Studien eine Steigerung der Mortalität bei Patienten mit akutem Nierenversagen, welche eine Diuretikatherapie erhielten (Mehta et al. 2002).

An dieser Stelle wurden nur einige besonders wichtige Punkte der pharmakologischen Interventionsmaßnahmen erläutert. Es zeigt sich bereits hier, dass die Möglichkeiten der medikamentösen Beeinflussbarkeit des ANVs limitiert sind. Aus diesem Grund sind häufig extrakorporale Nierenersatzverfahren erforderlich, um zusätzliche Komplikationen oder letale Verlaufsformen zu verhindern.

#### ***1.1.1.4 Therapie des akuten Nierenversagens – Teil 2***

Bis zum heutigen Tag lassen sich die komplexen Aufgaben der Niere (exkretorisch, endokrin, metabolisch) mit den zurzeit verfügbaren Organersatzverfahren nur unzureichend ersetzen (Samtleben und Blumenstein 1999). Im Falle eines akuten Nierenversagens ist im Allgemeinen bei nicht mehr ausreichender Eliminierung harnpflichtiger Substanzen (z.B. Kreatinin, Harnstoff oder sog. Urämietoxine) und bei auf eine konservative Therapie nicht mehr ansprechende Störung des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts eine NET indiziert (Samtleben und Blumenstein 1999).

Doch der optimale Zeitpunkt für den Beginn einer NET ist nach heutigem Stand der Wissenschaft nicht bekannt (Palevsky 2008).

Folgende, in Tabelle 4 aufgelistete allgemein anerkannte Punkte, dienen als Indikationshilfen zur Initiierung der NET.

**Tabelle 4:** Konventionelle Indikationen für eine NET beim ANV

Konventionelle Indikationen für eine Nierenersatztherapie beim akuten Nierenversagen
Intravaskuläre Volumenüberladung bei Unwirksamkeit von Diuretika
Eine anderweitig therapieresistente Hyperkaliämie
Eine therapieresistente metabolische Azidose
Intoxikation mit dialysierbaren Medikamenten oder Drogen
Offenkundige urämische Symptome, wie z.B. eine Enzephalopathie, Perikarditis oder eine urämisch blutige Diathese
Progressive Azotämie (abnorme Vermehrung von stickstoffhaltigen Endprodukten des Proteinstoffwechsels im Blut (hauptsächlich Harnstoff und Kreatinin))

Kriterien, die allgemein anerkannt sind, um eine Nierenersatztherapie beim akuten Nierenversagen zu initiieren (Palevsky 2008).

Unter den Begriff „Nierenersatztherapie“ fallen verschiedene Techniken, die jeweils auf unterschiedliche Weise und mit unterschiedlicher Effektivität die Beseitigung von Wasser und harnpflichtigen Substanzen sowie das Ausgleichen von Störungen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt (Kalium, Natrium, Kalzium, Phosphat, pH-Wert, Bikarbonat) erfüllen. Bei den einzelnen Verfahren werden für den Stofftransport verschiedene physikalisch-chemische Prozesse wie Osmose, Diffusion, Ultrafiltration und Konvektion benutzt (Samtleben und Blumenstein 1999). Bei der Osmose entsteht eine Druckdifferenz zwischen zwei Lösungen unterschiedlicher Konzentration, welche durch eine Membran voneinander getrennt sind, die vom Lösungsmittel, nicht aber von den gelösten Teilen passiert werden kann. Dies führt zu einem Übertritt des Lösungsmittels von der Seite der höheren zur Seite der niedrigeren Konzentration. Unter Diffusion versteht man den Konzentrationsausgleich zwischen Orten mit unterschiedlicher Konzentration von gelösten Stoffen auf Basis der Brownschen Molekularbewegung. Die Ultrafiltration ist dadurch gekennzeichnet, dass Flüssigkeit vom Ort des höheren Drucks zum Ort des niedrigeren Drucks durch eine semipermeable Membran gelangt. Von Konvektion spricht man, wenn bei der Ultrafiltration gelöste Teilchen durch die Membran mitwandern (Samtleben und Blumenstein 1999).



Die Nierenersatzverfahren werden einerseits nach der Art des Stoffaustauschs in Hämodialyse (Diffusion und Ultrafiltration), Hämofiltration (Konvektion), Hämodiafiltration (Kombination aus beiden) und die Peritonealdialyse, bei der das Bauchfell als semipermeable Membran genutzt wird, andererseits nach der zeitlichen Anwendung in intermittierend oder kontinuierlich unterteilt (Haller und Schelling 2000). Zusätzlich gibt es eine Filtrationsdifferenzierung auf Grund der treibenden Kraft. So kann als treibende Kraft der arterielle Blutdruck ohne zusätzliche maschinelle Pumpe ausreichend sein, wie es bei der spontan arteriovenösen Technik der Fall ist, oder die treibende Kraft durch Pumpen künstlich erzeugt werden, wie es bei der venovenösen Technik zu sehen ist (Samtleben und Blumenstein 1999, Haller und Schelling 2000). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die zurzeit benutzten Nierenersatzverfahren.

**Tabelle 5:** Übersicht über die Nierenersatzverfahren

<b>Hämodialyse</b>	
<b>Hämofiltration</b>	Intermittierend kontinuierlich: - kontinuierliche arterio-venöse Hämofiltration (CAVH) - kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration (CVVH)
<b>Hämodiafiltration</b>	Intermittierend kontinuierlich: kontinuierliche veno-venöse Hämodialyse und Hämofiltration (CVVHDF)
<b>Peritonealdialyse</b>	intermittierende Peritonealdialyse (IPD) kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse (CAPD) kontinuierliche zyklische Peritonealdialyse (CCPD)

Die Nierenersatzverfahren werden nach ihrer Funktionsart in Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration und Peritonealdialyse aufgeteilt und zusätzlich, je nach Anwendungsdauer, in intermittierend und kontinuierlich gegliedert (Samtleben und Blumenstein 1999).

Allen Verfahren, bis auf die Peritonealdialyse, ist gemeinsam, dass Blut entweder aus einem Brescia-Cimino-Shunt (eine operativ geschaffene arteriovenöse Fistel zwischen meist Arteria radialis und Vena cephalica), einem doppellumigen Venenkatheter oder einem arteriellen Katheter durch ein Schlauchsystem einem Hämofilter zugeführt und im Anschluss wieder dem Kreislaufsystem des Patienten zurückgegeben wird (Hörl und Wanner 2004, Diderichs 2007).

Das am häufigsten benutzte Verfahren ist die Hämodialyse (ca. 82 %), gefolgt von der Hämodiafiltration (ca. 9 %), der Peritonealdialyse (ca. 7 %) und schließlich der Hämofiltration (ca. 1 %) (Samtleben und Blumenstein 1999).

Jede Methode besitzt Vor- und Nachteile. So sind bei multimorbiden Patienten beim Einsatz der intermittierenden Hämodialyse Abfälle des Blutdrucks und Herzrhythmusstörungen verhältnismäßig häufige Schwierigkeiten. Andererseits sind CAVH und CVVH auf Grund des rein konvektiven Stofftransports wenig effektiv bei der Therapie von z.B. schweren Hyperkaliämien. In diesem Fall ergibt sich eine eindeutige Indikation für die CVVHDF (Samtleben und Blumenstein 1999). Allerdings gibt es auch Veröffentlichungen, die bei einer lebensbedrohlichen Hyperkaliämie eine intermittierende Hämodialyse verwenden würden (Haller und Schelling 2000), was die Schwierigkeit verdeutlicht, das richtige Verfahren für die einzelnen renalen und extrarenalen Komplikationen zu finden. Dieses wird weiter Bestandteil intensiver Forschung bleiben.

Bei Betrachtung der Prognoseentwicklung des ANVs in den letzten 100 Jahren ist festzustellen, dass die Prognose durch die Einführung der Hämodialyse Anfang der 50er Jahre gravierend gebessert werden konnte. Starben in der Ära vor der Entwicklung der Dialysegeräte noch fast 90 % der Patienten mit akutem Nierenversagen, wurde durch die Dialyse die Letalität Anfang der 50er Jahre auf 30-40 % reduziert (Kierdorf 2008). Seit diesem Zeitpunkt allerdings hat die Letalität bis Anfang der 90er Jahre konstant zugenommen (Kierdorf 2006b) und hat sich heutzutage auf einen beständigen Wert von 50-70 % eingependelt (Kierdorf 2000, Lameire et al. 2005, Lameire et al. 2006).

Ein wesentlicher Grund hierfür ist in einer Veränderung des Patientenguts in den letzten Jahrzehnten zu sehen. Die Anzahl unkomplizierter ANVs hat sich verringert, zur gleichen Zeit allerdings ist das ANV heutzutage zumeist Bestandteil eines Multiorganversagens, oft in Verbindung mit einer Sepsis (Kierdorf 2000, Lameire et al. 2005). Eine leichte Besserung dieser Situation lässt sich erst seit einigen wenigen Jahren finden (Xue et al. 2006), was aber nach wie vor einen erheblichen Spielraum für Verbesserungsmöglichkeiten lässt.

## **1.2 Proteomics**

Proteomics ist die systematische Studie von Proteomen, welche die gesamte Bandbreite der Proteine beschreibt, die sowohl in einer oder allen Zellen des Organismus als auch in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Schweiß enthalten sind (Müller et al. 2007).

Während das Genom eines Organismus als beinahe statisch angesehen wird, zeigen die Proteome dynamische Eigenschaften mit einem sich verändernden Proteinprofil, welches abhängig von einer Vielzahl von extra- und intrazellulären Stimuli (z.B. Zellzyklus, Temperatur, Stress oder Apoptosesignale) ist (Müller et al. 2007).

Heutzutage konzentriert sich die biomedizinische Proteom-Forschung entweder auf die Expressions-Proteomics, die die Hoch- und Herunterregulierung von Proteinen analysiert, oder auf die funktionellen Proteomics, mit dem Ziel molekulare Funktions- und Signalwege der Proteine zu entschlüsseln (Müller et al. 2007).

Ein Hauptziel der klinischen Proteomics ist die Entdeckung von Biomarkern, welche eine frühe Diagnose, ein frühes Risikomanagement oder ein therapeutisches Monitoring von Krankheiten erlaubt. Aus diesem Grund wird in klinischer Anwendung eine komparative Herangehensweise von normalen und abnormalen Zuständen der Zellen, Gewebe oder Körperflüssigkeiten benutzt, um diejenigen Proteine zu identifizieren, die quantitative Veränderungen im krankheitsspezifischen Vergleich zeigen, um diese dann als diagnostischen Marker oder als therapeutischen Angriffspunkt zu benutzen (Müller et al. 2007).

Identifizierte Biomarker im Serum oder Urin sind äußerst wünschenswert, da diese Proben leicht zu asservieren sind und sich gut für eine nicht-invasive Diagnostik eignen (Müller et al. 2007). Allerdings bringt die Verwendung von Urin und Blut nicht nur Vorteile mit sich, worauf in Abschnitt 5.5 näher eingegangen wird.

Von proteomischen Studien im Zusammenhang mit Körperflüssigkeiten wie z.B. Urin wird erwartet, krankheitsbezogene Proteinveränderungen von Gewebe oder zellulären Proteomen wiederzugeben und die Möglichkeit zu haben, neue nicht-invasive diagnostische Tests zu entwickeln, welche einen potentiellen Vorteil in Bezug auf niedrigere Kosten und eine bessere Patientenversorgung besitzen (Müller et al. 2007).

Urin spielt in der proteomischen Biomarkersuche eine bedeutende Rolle. Viele Abnormalitäten des Urogenitaltraktes werden auf den Urin übertragen, weswegen die proteomische Urinanalyse neben den im vorangegangenen Text genannten Vorteilen von großem klinischen Interesse für die Beurteilung der Niere und des restlichen Urogenitaltraktes ist (Dihazi und Müller 2007). Urin-Proteine sind von Bedeutung, weil ihre Menge und Zusammensetzung die renale Funktion und Störungen reflektieren (Killingsworth 1982).

Urin von gesunden Individuen beinhaltet nur geringe Mengen an Protein (bis zu 150 mg/d), wohingegen der Urin von Patienten, die an einer renalen Erkrankung leiden, einen höheren Wert besitzt. So ist der Schweregrad einer Proteinurie definiert anhand der Proteinausscheidungsmenge gemessen im 24 h-Urin. Eine Proteinausscheidung zwischen 30 und 300 mg/24 h gilt als „leichte“ Proteinurie, eine Ausscheidung bis 1,5 g/24 h wird als „mäßige“ und darüber hinausgehende Proteinverluste als „schwere“ Proteinurie bezeichnet. Des Weiteren kann mit Hilfe des Gewichtes der Urinproteine zwischen einer glomerulären, tubulären und gemischten Proteinurie unterschieden werden. Die glomeruläre Proteinurie

wird unter anderem weiter in eine selektive und unselektive Form eingeteilt. Die selektive glomeruläre Proteinurie ist durch die Ausscheidung von Proteinen charakterisiert, deren Molekulargewicht bei  $< 100$  kDa liegt. Sie wird durch die bevorzugte Ausscheidung von Albumin (Molekulargewicht 68 kDa) und Transferrin (Molekulargewicht 83 kDa) charakterisiert. Das unselektiv glomeruläre Proteinuriemuster hingegen zeigt ein Molekulargewicht von 156 kDa im Urin (Baenkler et al. 2001, Herold et al. 2011).

Die tubuläre Proteinurie wird gekennzeichnet durch einen Molekulargewichtsbereich, der zwischen 10 und 60 kDa liegt. Unter einer gemischten Proteinurie wird eine glomeruläre Proteinurie mit einer Beimengung von tubulären Proteinen, wie z.B.  $\beta_2$ -Mikroglobulin, verstanden (Baenkler et al. 2001, Herold et al. 2011).

Die Urin-Proteine setzen sich zusammen aus Plasmaproteinen, welche einen 30 %igen Anteil an den Gesamtproteinen im Urin haben, und Proteinen, die aus dem Nierengewebe stammen und einen Anteil von 70 % haben. Im Falle der Plasmaproteine entstammen diese theoretisch der glomerulären Filtration, wohingegen die von der Niere abgeleiteten Proteine verschiedene Ursprungsorte haben können, wie z.B. die renale tubuläre Sekretion von löslichen Proteinen, Zellabfälle oder die Sekretion von Exosomen (Thongboonkerd et al. 2002, Pieper et al. 2004).

### **1.2.1 2D-Gel-Elektrophorese in der Biomarkersuche**

Methodisch gibt es mittlerweile viele Ansätze, proteomische Analytik zu betreiben. Die 2D-Gel-Elektrophorese, wie sie in dieser Arbeit benutzt wurde, bietet hierbei trotz einiger Einschränkungen besondere Möglichkeiten. So ist es im besten Fall möglich, einen Überblick über die gesamten Proteine einer zu untersuchenden Probe in Form einer zweidimensionalen Karte zu schaffen (Dihazi und Müller 2007) und anschließend mittels tryptischen Verdaus und einer Identifizierung der einzelnen Proteine via Massenspektrometrie potentielle Proteinmarker im Urin zu finden.

Es gibt zahlreiche Publikationen, in denen mit Hilfe der 2D-Gel-Elektrophorese nach Biomarkern sowohl im Urin als auch im Serum gesucht wurde. Arthur et al. z.B. forschten nach neuen diagnostischen und prognostischen Markern für das akute Nierenversagen im Urin (Arthur et al. 2008). Ferner gibt es auch in anderen medizinischen Bereichen Beispiele, in denen Proteine als Biomarker mittels Proteomics ermittelt wurden. So konnte beispielsweise die Phosphoglycerinkinase 1 als serologischer Marker beim Lungenkarzinom gefunden werden (Chen et al. 2003), ein Fragment vom Komplement Faktor C3 und eine Isoform des Apolipoproteins A1 für das Leberkarzinom (Steel et al. 2003) oder das Hitzeschockprotein 27 als Frühmarker beim Mammakarzinom (Rui et al. 2003, Streich 2009).

## 1.2.2 Weitere Methoden zur Biomarkersuche

Neben der klassischen 2D-Gel-Elektrophorese mit anschließender Identifizierung regulierter Proteine gibt es eine Reihe anderer Methoden, die zurzeit im Bereich der Biomarkerforschung zur Anwendung kommen und durch die rasanten Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie begünstigt werden.

So konnte eine fehlende Standardisierung der Analysemethoden durch die Einführung von DIGE (*differential in gel electrophoresis*) minimiert werden. Hier werden zwei Protein-Proben mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen auf dasselbe Gel aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgt auf demselben Gel und steigert einerseits die Reproduzierbarkeit der Gele, andererseits die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen (Timms und Cramer 2008).

Trotz der Fortschritte in der 2D-Gel-elektrophoretischen Technologie bestehen weiterhin Probleme in der Anwendung dieses Verfahrens, dass z.B. sehr stark basische oder saure Proteine verloren gehen könnten oder dass das Verfahren nicht zu automatisieren und sehr arbeitsintensiv ist (Dihazi und Müller 2007), weswegen auch einige Forschungsgruppen zu gelfreien Systemen tendieren. In diesem Zusammenhang ist SELDI (*Surface enhances laser desorption/ionization*) gesondert zu nennen. Diese Methode wurde bereits von der Arbeitsgruppe Dihazi et al. und weiteren Forschungsgruppen zur Biomarkeridentifizierung etabliert und benutzt (Weinberger et al. 2002, Miguet et al. 2006, Dihazi et al. 2007). Verglichen mit den gelbasierten Methoden, hat die SELDI-Massenspektrometrie unter anderem den Vorteil der Automatisierung, was potentiell eine klinische Nutzung möglich macht (Weinberger et al. 2002, Miguet et al. 2006).

Auf die zahlreichen weiteren Methoden wird hier nicht näher eingegangen. Doch es zeigt sich, dass speziell in der Biomarkerforschung großes Potential in der Proteomik steckt und rasante Fortschritte in der Entwicklung weiterer Techniken in diesem Bereich gemacht werden.

## 2 Fragestellung und Ziel der Studie

Obwohl sich das Management des akuten Nierenversagens auf der Intensivstation mit den Möglichkeiten der modernen Methoden der NET verändert hat (Karsou et al. 2000, Mehta et al. 2002), haben diese Veränderungen nicht zu einer Verbesserung des Outcome der Patienten geführt (Mehta et al. 2002).

Während die in Kapitel 1.1.1.4 genannten Indikationen für eine NET gut akzeptiert sind, bleiben sie aber auch Gegenstand mannigfaltiger Interpretationen und Kritik.

Wie schwer muss der Grad der Volumenüberladung, der Hyperkaliämie oder der metabolischen Azidose sein, um mit einer NET zu beginnen? Was, wenn erst alle medizinischen Therapien versucht werden sollten, bevor man mit der NET beginnt? Wenn mit einer diuretischen Therapie begonnen wurde, macht welche Dosis eine diuretische Resistenz aus (Palevsky 2008)? Beispielhaft werden hier nur einige Fragen aufgegriffen, zu denen kontrovers diskutiert wird.

Des Weiteren sollten absolute Indikationen für den Beginn eines Nierenersatzverfahrens (wie z.B. die bedrohliche Hyperkaliämie oder die urämische Enzephalopathie) auf einer modernen Intensivtherapie mit gut geschultem Personal und gutem technischen Standard nur noch selten zu beobachten sein.

Daneben zeigte sich nach Beobachtung der praktischen Durchführung einer NET in verschiedenen Krankenhäusern, dass es keine einheitlichen Standards in der Versorgung von Patienten gibt und eine große Variation in der klinischen praktischen Durchführung der NET existiert (Overberger et al. 2007).

Die spezifische Handhabung der NET hat möglicherweise Einfluss auf das Outcome des ANVs. Zudem zeigen einige Studien, dass die Optimierung des renalen Supports die hohe Mortalität reduzieren kann (Liano und Pascual 1996, Liano et al. 1998, Uchino et al. 2005).

Obwohl viele klinische Untersuchungen die Wirkung der Dosis (Ronco et al. 2000, Bouman et al. 2002, Schiffil et al. 2002, Saudan et al. 2006) und der Ausführungsart (Mehta et al. 2001, Augustine et al. 2004, Uehlinger et al. 2005, Vinsonneau et al. 2006) der NET prospektiv ausgewertet haben, ist die Literatur über den Zeitpunkt des Beginns einer NET weit weniger aussagekräftig (Palevsky 2008).

In diesem Bereich besteht noch sehr viel Forschungsbedarf.

Ziel dieser Arbeit ist das Auffinden von Prädiktoren, welche imstande sind, einen adäquaten Zeitpunkt für die Initiierung einer NET bei akutem Nierenversagen zu bestimmen.

Es werden bei der Ausführung des Projekts zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Auf der einen Seite wird versucht durch bereits im Krankenhaus etablierte Messparameter von Patientenblut und –urin, einen Algorithmus zu berechnen, der bei der Entscheidungsfindung, ob bei einem aufgetretenen akuten Nierenversagen dialysiert werden muss oder nicht, helfen soll.

Auf der anderen Seite wird auf Basis der 2D-Gel-Elektrophorese und Massenspektrometrie eine proteomische Urinanalytik betrieben, um einen Biomarker zu identifizieren, welcher die Früherkennung eines dialysepflichtigen akuten Nierenversagens ermöglichen kann.

## **3 Patienten, Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 Studiendesign**

Es handelt sich um eine prospektive, klinisch-experimentelle Studie, welche auf Patienten beruht, die in der Zeit von Oktober 2006 bis Januar 2008 in der Universitätsmedizin Göttingen ausgewählt wurden.

Alle Patienten bzw. stellvertretend ihre gesetzlichen Vertreter wurden anhand eines Aufklärungs- und Einwilligungsbogens über die Studie informiert und auf die benötigten Blut- und Urinproben sowie die im Zusammenhang mit der Auswertung erfolgende separate Datenerfassung hingewiesen. Alle Patienten bzw. stellvertretend ihre gesetzlichen Vertreter, die sich bereit erklärten, an der Studie teilzunehmen, wurden aufgefordert, einen Einwilligungsbogen zu unterschreiben. Auch wurden sie über die Möglichkeit unterrichtet, jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne entstehende Nachteile von der Studie zurücktreten zu können. Eine Kopie des Ethikantrags und des Aufklärungs- und Einwilligungsbogens ist im Anhang zu finden.

#### **3.1.2 Aufnahme der Patienten**

Im Rahmen der Studie wurden Patienten, die in der Universitätsmedizin Göttingen stationär behandelt wurden, nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt:

##### ***3.1.2.1 Einschlusskriterien***

Es wurden in der oben genannten Zeitperiode alle Patienten in diese Studie eingeschlossen, bei denen ein ANV vermutet wurde oder bei denen erhebliche Risiken bestanden, im weiteren Verlauf ihres Klinikaufenthaltes ein dialysepflichtiges ANV entwickeln zu können. Da diese Studie außer der Abnahme weniger Blutproben und Urin (s.u.) keine Beeinträchtigung des Patienten zur Folge hatte, wurden die Einschlusskriterien bewusst großzügig formuliert und sind daher nur als Richtlinie zu verstehen. Als Anhaltspunkt zum Einschluss galten folgende Situationen, welche an Hand einiger Veröffentlichungen modifiziert wurden (Bock 1998, Bellomo et al. 2004a, Kierdorf 2006a, Mehta et al. 2007):

- Es liegt ein Serum-Kreatininanstieg von mehr als 0,5mg/dl im Vergleich zu einem Vorwert, der nicht älter als eine Woche ist, vor.



- Ein aktueller Kreatinin-Vorwert liegt nicht vor, es ist jedoch seit dem letzten zur Verfügung stehenden Vorwert möglicherweise eine Nierenschädigung eingetreten (z.B. durch Medikamente/Kontrastmittel, Blutdruckabfall/Schock oder Ähnliches).
- Der Patient ist oligurisch (Diurese kleiner 500 ml/d) oder es bestehen klinische Zeichen der Überwässerung.
- Bei dem Patienten besteht oder bestand in den letzten 12 h vor Einschluss ein Kreislaufschock.
- Bei dem Patienten besteht ein Volumenmangel oder dieser kann aufgrund der Klinik oder Anamnese vermutet werden.

### **3.1.2.2 Ausschlusskriterien**

- Der Patient lehnt die Teilnahme an der Studie ab.
- Es besteht eine chronische Niereninsuffizienz mit Serum-Kreatinin-Werten von über 2,5 mg/dl über einen längeren Zeitraum hinweg.
- Der Patient war bereits vor Aufnahme in diese Studie dialysepflichtig niereninsuffizient.

### **3.1.3 Studienablauf und Dokumentation**

Der Einschlussstag eines Patienten wurde als T (Tag) 0 bezeichnet. Folgende Proben wurden innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme abgenommen:

- Blut für eine Serum- und zwei 7,5 ml EDTA-Monovetten
- 10-100 ml Urin.

Zur Gewinnung der Urinproben wurde entweder Mittelstrahlurin benutzt oder Urin aus dem Katheterschlauch, da die meisten Patienten am Einschlussstag auf der Intensivstation lagen und bereits einen Blasenkatheter besaßen.

Die Serummonovette und ca. 10 ml Urin (in einer Urinmonovette) wurden an die klinische Chemie, eine weitere 10 ml Urinmonovette an das nephrologische Labor der Universitätsmedizin Göttingen geschickt.

Folgende Parameter wurden in den Laboratorien am Tag 0 zu jedem Patienten bestimmt und dokumentiert: Neben den Standard-Blut-Parametern Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Leukozyten, Harnstoff-N, C-reaktives Protein (CRP), Kreatinin, Natrium, Kalium wurden im Urin die Konzentration für Kreatinin, Protein, Natrium, Kalium, Harnstoff-N, Albumin und Osmolarität durch Standard-Routine-Methoden in den Laboratorien bestimmt. Des Weiteren wurde, falls bekannt, ein Tagesvorwert des Serum (S)-Kreatinins und der niedrigste bekannte

S-Kreatinin-Wert während des Klinikaufenthaltes aufgezeichnet. Zusätzlich dazu wurden die Flüssigkeitsbilanz und die tägliche Diurese notiert. Neben den Standardlaborwerten wurden auch folgende Werte mit im Handel käuflichen Standard-Mess-Kits ermittelt: Komplementfaktoren C3c und C4, Cystatin C im Serum,  $\alpha$ 1-Mikroglobulin und Albumin im Urin (alle fünf Dade Behring, Deutschland), anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) und anti-nukleäre Antikörper (ANA) (beide Inova Diagnostics, USA), anti-glomeruläre Basalmembran (GBM) Antikörper (Human, Deutschland), zirkulierende Immunkomplexe (Phadia AB, Schweden), Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  (Dade Behring, Deutschland). Alle Messvorgänge wurden gemäß Herstellerprotokoll vollzogen.

Des Weiteren wurden Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, BMI, Station, das RIFLE- und das AKIN-Stadium, der SAPS2-Score (ein Punktesystem, welches unter anderem eine Aussage über den physiologischen Zustand eines Patienten trifft (Le Gall et al. 1993)) und der Aufnahmegrund jedes einzelnen Patienten aufgezeichnet und dokumentiert, ob folgende Grunderkrankungen bei diesen bestanden: Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, KHK, COPD, pAVK, chronisch kompensierte Niereninsuffizienz, kongestive Herzinsuffizienz.

Der restliche Urin wurde bei 1000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand in 10 ml Probengefäße aliquotiert und für die spätere Untersuchung in einem -80 °C Kühlschank aufbewahrt. Ebenso wurde eine EDTA-Monovette gefüllt mit Blut bei 1000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand in 2 ml Eppendorfggefäße aliquotiert und wie der Urin für die weitere Verwendung in dem -80 °C Kühlschank gelagert. All dies passierte unmittelbar nach der Probenentnahme.

### **3.1.4 Einteilung der Gruppen**

Nach Studieneinschluss wurde jeder Patient einer der folgenden zwei Gruppen zugeteilt.

#### ***3.1.4.1 Nicht-Dialyse-Gruppe (ND)***

In diese Gruppe wurden alle Patienten eingeteilt, deren renale Funktion sich im Verlauf ohne Einsatz einer Nierenersatztherapie stabilisierte, d.h. die während des gesamten Krankenhausaufenthaltes bis zum Zeitpunkt der Entlassung keine extrakorporalen Maßnahmen benötigten.

### 3.1.4.2 Dialyse-Gruppe (D)

In diese Gruppe wurden alle Patienten eingeteilt, deren akutes Nierenversagen dialysepflichtig wurde, wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Arten der Nierenersatztherapie gemacht wurde (näheres s. Abschnitt 1.1.1.4). Die Indikation dazu wurde nach bisherigem Stand des medizinischen Wissens getroffen (s. Abschnitt 1.1.1.4). Im Allgemeinen wurden sowohl nephrologisch relevante Blutparameter wie Serum-Harnstoff-N, S-Kreatinin als auch die Flüssigkeitsbilanz für die Entscheidung zur Durchführung einer Nierenersatztherapie miteinbezogen, wobei man keinen Grenzwert für die einzelnen Parameter festlegte (John und Eckardt 2007). Daneben waren unter anderem eine Volumenüberladung infolge einer inadäquaten Diurese trotz ausreichender Diuretikagabe oder Zeichen vital bedrohlicher Störungen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes Indikationen für eine Nierenersatztherapie.

Die Entscheidung, welche Art der Nierenersatztherapie zum Einsatz kam, wurde individuell getroffen.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden auf Grund der Sicherstellung der Sterilität, Kontaminationsgefahr und Reinheit als Einwegartikel verwendet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Urin-Becher 100 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Reaktionsröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgesäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfgesäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,6 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Halbmikroküvetten	Sarstedt,
Handschuhe Peha Soft	Hartmann, Heidenheim
Serological Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Vivaspin 20 5000MWCO PES	Sartorius, Göttingen
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Readystrip IPG Strips 11 cm pH 5-8	Bio-Rad, München
Readystrip IPG Strips 11 cm pH 3-10	Bio-Rad, München
Criterion Tris-HCl Gel 10-20 % Linear Gradient Gel IPG+1Well 11 cm IPG Strip	Bio-Rad, München

Criterion XT Bis-Tris 12 % Resolving Gel IPG+1Well 11 cm IPG Strip	Bio-Rad, München
Gelfärbeschalen	Roth, Karlsruhe
Marker 1 (Precision Plus Protein; Kaleidoscope Standard)	Bio-Rad, München
Marker 2 (Page Ruler™ Unstained; Protein Ladder)	Fermentas Vilnius
Cardiac FABP Antibody (Rabbit polyclonal to cardiac FABP)	Abcam
Liver FABP Antibody (Rabbit polyclonal to liver FABP)	Abcam
Dot Blot - Membran (Amersham Hybond-ECL)	GE Healthcare
Milchpulver	Merck

### 3.2.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Roche AG (Mannheim), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim), Bio-Rad GmbH (München), Serva GmbH (Heidelberg) und Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a. oder reinst. 96 %. Reinstwasser (Milli-Q) wurde aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Billerica, USA) bezogen und hatte eine Leitfähigkeit von mehr als 18 MΩ cm.

### 3.2.3 Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
BSA-Standard	1 mg /ml in Milli-Q, Sigma-Aldrich, Steinheim
Rehydratationspuffer	6,0 M Urea, 2 % (w/v) CHAPS, 25 mM DTT, 0,2 % Ampholyte, 0,001 % Bromphenolblau
Äquilibrierungspuffer I (DTT)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) DTT , 0,001 % Bromphenolblau
Äquilibrierungspuffer II (IAA)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (w/v) Iodacetamid , 0,001 % Bromphenolblau
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	181,71 g/l Tris-HCl mit rauchender Salzsäure auf pH 8,8 einstellen
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	60,57 g/l Tris-HCl Mit rauchender Salzsäure auf pH 6,8 einstellen
Rotiphorese Gel 30 (37,5 :1)	Carl Roth, Karlsruhe
Reinstwasser	Ampuwa®, Wasser für Injektionszwecke
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
5 x Tris-Glycin Elektrophoresepuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS
20 x MOPS-Puffer	Bio-Rad, München
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 186 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl

	Mit rauchender Salzsäure auf pH 7,4 einstellen
TBS-T	TBS + 0,02 % Tween-20
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entwickler	0,6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,016 % (v/v) Formaldehyd, 0,004 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Lösung zur Silberfärbung	0,2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,026 % (v/v) Formaldehyd
Coomassie Färbelösung	Roti <sup>®</sup> -Blue (5x Konzentrat)
Lösung A	5 % (v/v) ACN in 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Lösung B	95 % (v/v) ACN in 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Lysepuffer	9,5 M Urea, 4 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT Proteaseinhibitoren Complete <sup>®</sup> EDTA Free (Roche)
Waschpuffer	50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05 % (w/v) Tween-20, pH 7,4
Blockungspuffer	5 g Milchpulver in 100 ml Waschpuffer gelöst (5 % Milchlösung)

### 3.2.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Vortexer	REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermomixer comfort		Eppendorf, Hamburg
Waage	Universal	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge	Optima <sup>™</sup> TL Ultrazentrifuge 100.000 Umdrehungen pro Minute, Modell TL-100	Beckmann, Palo Alto, USA
Spektrometer	Lambda 25 UV/VIS	Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart
Laserscanner	FLA-5100	Fujifilm
MALDI-TOF/MS	Voyager DE-STR	Applied Biosystems, CA, USA
Fokussiereinheit	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Elektrophoresesystem	13cm x 8cm	Bio-Rad, München
Rotationsschüttler	GFL 3005	GFL, Burgwedel
pH-Meter	Basic pH Meter pB-11	Sartorius, Göttingen
Q-TOF MS/MS	Ultima Global	Micromass, Manchester, UK
Behring Nephelometer Analyzer 2	BN*System	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Dimension X-Pand		Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland

### 3.2.5 Spezielle Laborparameter

Wert	Entnahmemöglichkeit	Name Kit	Firma
Interleukin-1beta	75 µl Serum oder Heparin-Plasma	Immulite IL-1beta	Siemens Medical Diagnostics Limited, United Kingdom
Interleukin-6	75 µl Serum oder Heparin-Plasma	Immulite IL-6	Siemens Medical Diagnostics Limited, United Kingdom
ANA	Serum	Nova Lite Hep-2	Inova Diagnostics, Inc. San Diego, USA
ANCA	Serum	Nova Lite ANCA	Inova Diagnostics, Inc. San Diego, USA
C1q Binding Circulating Immune Complexes (IgG)	Serum	IMTEC-CIC IgG	Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland
TNF $\alpha$	100 µl Serum oder Heparin-Plasma	Immulite/Imm ulite 1000 TNF $\alpha$	Siemens Medical Diagnostics Limited, United Kingdom
Anti GBM Antibodies	Serum	ELIA GBM	Phadia AB, Uppsala, Sweden
Cystatin C	Serum und Heparin-Plasma	N Latex Cystatin C (NCYSC)	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
CRP	Serum und Heparin-Plasma und EDTA-Plasma	CardioPhase*hsCRP	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
$\alpha$ 1-Microglobulin	Urin	N Antisera to Human $\alpha$ 1-Microglobulin	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
C3c, C4	Serum und Heparin-Plasma und EDTA-Plasma	N Antisera to Human Complement Factors (C3,C4)	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Albumin	Serum und Heparin-Plasma und EDTA-Plasma oder Urin	N Antiserum to Human Albumin	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Kreatinin	Serum, Plasma und Urin	Flex reagent cartridge Crea	Dade Behring limited, United Kingdom
Urin-Protein	Urin	Flex reagent cartridge UCFP	Siemens Medical Diagnostics Limited, United Kingdom

### 3.2.6 Wissenschaftliche Software

Programm	Verwendungszweck	Hersteller
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation, USA
Delta 2D	2D-Gel-Elektrophorese Analyse	Decodon, Braunschweig
Data Explorer Voyager V5.0	MALDI-TOF Datenanalyse	Applied Biosystems, Laguna Beach, USA
Multi Analyst Version 1.1	Densitometrieanalyse	Bio-Rad, München
Mascot	Proteindatenbanksuchmaschine	www.matrixscience.com
MassLynx, Version 4.0	Software für Massenspektrometer	Waters, Massachusetts, USA
Swissprot	Proteindatenbank	www.expasy.org/uniprot/
Harvester	Proteindatenbank	www.harvester.embl.de
UV WinLAB	Molekular Spektroskopie	
R 2.6	Kalkulationen	www.r-project.org
Prism 5	graphPad	www.graphpad.com
Image J	Bildbearbeitung	http://rsbweb.nih.gov

### 3.3 Statistische Methoden

Die verschiedenen Charakteristiken und Krankheiten der Patienten zwischen den Gruppen ND und D wurden mit Hilfe des  $\chi^2$  Tests verglichen, wohingegen metrische Parameter entweder mit dem t-test oder dem Wilcoxon rank-sum Test verglichen wurden. Die Normalverteilung der Parameter, welche mit dem t-test analysiert wurden, wurde vorher durch Quantile-Quantile-Plots überprüft.

Die prognostische Stärke der Parameter, welche sich als signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen zeigten, wurden mit Receiver Operator Characteristic (ROC) – Kurven, sowie mit der Leave-One-Out Kreuzvalidierung (LOOCV) analysiert. In allen ROC-Analysen wurden die Sensitivität, Spezifität, und Trennschärfe (durch die „Area under the curve“ (AUC)) der einzelnen Parameter oder des Regressionsmodells untersucht. Die AUC ist eine Schätzung der potentiellen Trennschärfe eines Parameters oder einer Kombination aus verschiedenen Parametern. Die Trennschärfe gibt den Anteil an richtig klassifizierten Individuen an.

Um ein besseres Klassifikationsmodell zu finden, wurden die aussichtsreichsten Parameter in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Klaus Jung aus der medizinisch statistischen Abteilung der Universität Göttingen mit Hilfe der logistischen Regression und anschließender schrittweiser

Variablenselektion kombiniert. Das neue Klassifikationsmodell wurde wiederum durch eine ROC-Analyse evaluiert.

Alle Tests wurden mit einer Signifikanzgrenze von  $\alpha = 0,05$  durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit dem frei erhältlichen Programm R 2.6 (Version 2.6, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) erstellt.

### **3.4 Proteinbiochemische experimentelle Methoden**

#### **3.4.1 Bradford Proteinbestimmung**

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 formt in saurer Lösung mit den kationischen, nichtpolaren und hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum des Farbstoffes verändert sich durch die Komplexbildung von seiner ungebundenen zu seiner komplexierten Form von 470 nm zu 595 nm (Bradford 1976).

An Hand einer Kallibrierungskurve, welche durch eine Korrelation der Zunahme der Absorption des Protein-Farbstoffgemisches mittels eines Standardproteins bekannter Konzentration erstellt wird, können Proteinmengen bestimmt werden. Die Kallibrierungskurve ist nur in großer Verdünnung linear ansteigend und für jedes einzelne Protein verschieden. Je nach Verwendungszweck können Standardproteine wie Chymotrypsin, Lysozym, IgG oder BSA benutzt werden.

Der Test wurde in Küvettenform durchgeführt. Nach Verdünnung des Bradford-Reagenzes im Verhältnis 1:5 wurde diese mit den Mengen 998, 996, 994, 992 und 990  $\mu\text{l}$  jeweils in eine Küvette gegeben und diese mit der BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{l}$  auf eine Füllmenge von insgesamt 1 ml aufgefüllt.

Es wurde aus der Auftragung der Absorptionswerte gegen die BSA-Konzentration eine Kallibrierungskurve erstellt. Mittels Steigung, Verdünnung der Probe, Probenvolumen und Leerwert des Probenpuffers errechnete sich die Konzentration.

#### **3.4.2 Probenaufarbeitungsmethoden**

##### **3.4.2.1 Acetonfällung**

Die Löslichkeit eines Proteins in wässrigen Lösungen ist abhängig von der Zusammensetzung der Aminosäureseitenketten des jeweiligen Proteins. Die Löslichkeit in wässrigen Lösungen ist eher schwach, wenn es sich bei den Seitenketten vorrangig um hydrophobe, unpolare Residuen handelt, wohingegen sie bei polaren, hydrophilen Residuen gut ist.



Wird ein kurzkettiges organisches Lösungsmittel, wie z.B. Methanol, Ethanol, Aceton, Acetonitril hinzugegeben, erfolgt eine Herabsetzung der Hydratationskraft der Lösung, wodurch die Proteine aufgrund ihrer freigelegten Seitenketten über elektrostatische oder Van-der-Waals-Kräfte miteinander interagieren und aggregieren können. Diese Aggregate können dann durch Zentrifugation getrennt werden.

Bei der Acetonfällung vermischt man die zu fällende Probe im Verhältnis von 1:3 mit eiskaltem Aceton und inkubiert diese bei -20 °C über Nacht.

Anschließend erfolgte bei einem Probenvolumen von bis zu 2 ml ein Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g bei 4 °C für 10 Minuten.

Nach Sedimentation wurde der Überstand verworfen. Als Waschschrift wurden 500 µl eiskaltes Aceton zum Pellet hinzugegeben und alles wiederum gut vermischt. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation bei 21.000 x g bei 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Diesen Waschschrift wiederholte man insgesamt dreimal, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Anschließend wurde die Probe auf Eis für 30 Minuten luftgetrocknet. Das Pellet wurde dann in Rehydratationspuffer, wie es in Abschnitt 3.2.3 beschrieben wurde, neu aufgenommen und bis zur späteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.2.2 Ethanolfällung**

Neben Aceton wurde Ethanol, ein weiteres organisches Lösungsmittel, zur Fällung der Proteine benutzt. Dies beruht auf dem gleichen Wirkmechanismus, wie es unter Kapitel 3.4.2.1 beschrieben ist.

Bei der Ethanolfällung wurde die zu fällende Probe im Verhältnis von 1:3 mit eiskaltem Ethanol vermischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt: 21.000 x g bei 4 °C für 10 Minuten bei Proben mit einem Volumen von < 500 µl.

Nach Sedimentation wurde der Überstand verworfen. Als Waschschrift wurden 500 µl eiskaltes Ethanol zum Pellet hinzugegeben und alles wiederum gut vermischt. Anschließend ging man entsprechend Abschnitt 3.4.2.1 vor.

#### **3.4.2.3 Chloroform-Methanol-Extraktion**

Gemäß dem Protokoll von Wessel, welches für ein Probenvolumen von 100 µl anwendbar ist, wurde diese Extraktion durchgeführt (Wessel und Flugge 1984).

Es findet eine Vermischung von 100 µl einer Proteinprobe mit 400 µl eiskaltem Methanol statt. Anschließend erfolgen die Zugabe von 100 µl Chlorophorm und eine erneute Vermischung. Nach Zugabe von 300 µl Milli-Q und Durchmischung wird die Probe für eine Minute mit 14.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Bei Ausbildung eines 2-Phasensystems befindet sich das präzipitierte Protein zwischen den beiden Phasen. Nach Abnahme und Verwerfung der wässrigen Phase werden 600 µl Methanol hinzugegeben und gut durchmischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 14.000 g bei 4 °C für 1 Minute wird der Überstand verworfen und entsprechend Abschnitt 3.4.2.1 vorgegangen.

#### ***3.4.2.4 Ankonzentrierung und Entsalzung mittels Vivaspin®-Konzentratoren***

Bei dieser Konzentrationsart mittels Vivaspin 15 handelt es sich um eine Ultrafiltration mit einer 5000 Da MWCO-Membran. Es können Probenvolumen von bis zu 20 ml eingeengt werden. Die Probenflüssigkeit wird durch Zentrifugalkräfte durch die Membran gepresst, so dass man ein Retentat erhält, in dem sich mit einer hohen Wiederfindungsrate alle Proteine befinden sollen, die größer als 5000 Da sind. Durch Hinzufügen eines Puffers kann die Probe entsalzt und ankonzentriert werden.

Die Zentrifugation kann je nach Probenbeschaffenheit und Proteinkonzentration bis zu 4 h andauern.

### **3.4.3 Die Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese**

Die 2D-Gel-Elektrophorese besteht aus zwei Stufen: die isoelektrische Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension und die Auftrennung der Proteine gemäß ihres Molekulargewichtes in der SDS-PAGE. Die 2D-Gel-Elektrophorese wurde nach den Protokollen von Dihazi et. al. (Dihazi et al. 2005, Dihazi et al. 2009) durchgeführt.

#### ***3.4.3.1 Isoelektrische Fokussierung***

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine aus der zu untersuchenden Probe gemäß ihrer Nettoladung aufgetrennt. Diese setzt sich dabei aus dem relativen Gehalt saurer und basischer Aminosäureseitenketten und dem umgebenden pH-Wert zusammen. An einem definierten pH-Wert heben sich die Ladungen eines Proteins auf, so dass sich das Molekül nach außen hin ladungsneutral verhält. Diese Position, bei dem die Nettoladung eines Proteins null ist, bezeichnet man als Isoelektrischen Punkt eines Proteins (Westermeier 2004).

In dem in dieser Arbeit benutzten System der Firma Bio-Rad erfolgt die Trennung über einen gelbasierten immobilisierten pH-Gradienten. Die Gelmatrix ist auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert und wird im getrockneten, gefrorenen Zustand geliefert (IPG-Streifen). Aus diesem Grund ist eine lange Rehydratationszeit nötig.

150 µg des aufzutrennenden Proteingemisches wurden in Rehydrationspuffer zum Auftragen in die Fokussierungswanne pipettiert, wo es von dem IPG-Streifen aufgenommen wurde. Nach ungefähr einer Stunde wurde der IPG-Streifen mit 2 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen des Streifens zu verhindern.

Um die passive Rehydratation in das Gel zu gewährleisten, benötigte der Streifen eine Rehydratationszeit von mindestens zwölf Stunden bei einer Temperatur von 20 °C. Erst nach Verstreichen dieser Zeitspanne wurde eine Kaskade unterschiedlichster Spannungsstärken, wie in Tabelle 6 angegeben, angelegt, die neben einem guten Proteineintritt auch eine vollständige Fokussierung sicherstellen sollte.

**Tabelle 6:** Fokussierungsprogramm IPG-Streifen 11 cm für Citerion®-Kammer

Schritt	Voltstärke [V]	Gradient	Zeit [h]	Funktion
Schritt	Voltstärke	Gradient	Zeit	Funktion
1	500 V	Rapid	1	Proteineintritt
2	1000 V	Rapid	1	Proteineintritt
3	1000-8000 V	Linear	4	Fokussierung
4	10000 V	Rapid	30.000 Vh	Fokussierung
5	500 V	Rapid	12	Step and Hold

Die Proteinmengen sind je nach Probenotyp und je nach der anschließenden Färbemethode zu wählen. Die für diese Studie benutzten Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

**Tabelle 7:** Maximale Proteinmengen für die isoelektrische Fokussierung

IPG-Streifen	Silberfärbung	Flamingo®-Färbung	Coomassiefärbung
11 cm Citerion®			
Proteinmenge	50 µg	150 µg	150 µg

Das maximale Rehydratationsvolumen (Probe + Rehydrationspuffer) beträgt bei den 11 cm – IPG-Streifen 215 µl.

Nach abgeschlossener isoelektrischer Fokussierung wurden die Streifen aus der Fokussierwanne genommen, vom Öl befreit und daraufhin für jeweils 20 Minuten nacheinander in Äquilibratorpuffer I und II inkubiert. Die Zusammensetzung dieser Puffer ist in Abschnitt 3.2.3 beschrieben.

Die fertig fokussierten Streifen wurden entweder weiterbearbeitet oder eingeschweißt und bei -20° C aufbewahrt.

Die Cysteine der Proteine werden während der Inkubation mit DTT reduziert und anschließend im zweiten Äquilibrierschritt mittels Iodacetamid carbamidomethyliert. Dadurch wird verhindert, dass sich reduzierte Disulfidbrücken während der 2. Dimension (SDS-PAGE) nicht erneut verbinden.

Während dieses Schritts werden die Cysteine irreversibel modifiziert. Dadurch entsteht ein Massenschiff von 57,034 Da (monoisotopische Masse), welcher bei der Identifizierung der Proteine berücksichtigt werden muss.

### **3.4.4 Proteinelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel**

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (kurz: SDS-PAGE für *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Das anionische (negativ geladene) Detergens SDS bindet hierbei an die Proteine und überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass die Trennung im elektrischen Feld ausschließlich nach der Größe des Proteins und nicht nach der Ladung stattfinden kann (Laemmli 1970). Die Disulfidbrücken werden durch Zugabe eines reduzierenden Agens (DTT; TCEP, Mercaptoethanol) aufgespalten und die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins aufgebrochen, so dass das Protein nahezu linearisiert vorliegt.

Die denaturierten Proben werden zur Auftrennung auf ein Gel aus Polyacrylamid aufgetragen, an das eine Spannung angelegt wird, wobei das Gel wie ein Sieb fungiert. Kleine Proteine können schneller durch die Matrixstruktur des Gels gelangen als große Proteine. Entscheidend für die Siebwirkung des Gels ist die Konzentration des Acrylamids und dessen Quervernetzung. Für diese Arbeit wurden kommerziell verfügbare Fertiggele (Criterion®) mit einem Bis-Tris-Puffersystem benutzt, welche über ein gelinternes Reduktionsmittel verfügen und unter neutralen Bedingungen (pH6,5 – pH 6,8) gegossen werden.

Als Elektrolyt wurde ein Bis-Tris-Puffersystem (XT MOPS Lauf Puffer von Bio-Rad) verwendet.

### **3.4.5 Gelfärbungsmethoden**

#### **3.4.5.1 Silberfärbung**

Die Silberfärbung ist ein Verfahren zur Anfärbung von Proteinen. Durch die Präsenz der Proteine im Gel ergibt sich in ihrer Umgebung ein leicht reduzierendes Milieu. Durch Zugabe

von gelöstem Silber lagern sich vermehrt Silberionen an, die man im Entwicklungsschritt mittels alkalischen Formaldehyds zu elementarem Silber reduziert. Es kommt zu einem schwarzen Niederschlag im Gel direkt dort, wo sich Proteine oder andere reduzierende Agenzien befinden. Diese Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus. Tabelle 8 zeigt die Schritte, die zur Färbung eines Gels nötig sind.

**Tabelle 8:** Inkubationszeiten und Lösungen, wie sie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben sind, der Silberfärbung

Schritt	Lösung	Zeit	Beschreibung
1	Fixierlösung	10 h oder über Nacht	Fixieren
2	50 % (v/v) Ethanol	1 h	Waschen
3	Milli-Q	2 x 20 Minuten	Waschen
4	0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2 Minuten	Sensitizing
5	Milli-Q	2 x 2 Minuten	Waschen
6	Lösung zur Silberfärbung	20 Minuten	Silberfärbung
7	Milli-Q	2 x 2 Minuten	Waschen
8	Entwickler	2-10 Minuten	Entwicklung
9	5 % (v/v) Essigsäure	-	Stoppen
10	1 % (v/v) Essigsäure	-	Lagerung

Bei der Silberfärbung handelt es sich nicht um eine Endpunktfärbung. Je nach Einwirk- und Entwicklungszeit ergeben sich unterschiedliche Spotintensitäten. Zudem werden die Arginin- und Lysinresiduen der Aminosäureseitenketten durch die Gabe von Formaldehyd irreversibel modifiziert. Aufgrund dieser Modifikation ist die spezifische Spaltstelle des Trypsins verändert. Dies resultiert in einer verminderten enzymatischen Spaltung des Proteins in Peptidfragmente und somit in einer potentiell schlechteren Identifizierbarkeit der Proteine. Silber gefärbte Gele lassen sich mit dem Fuji-FLA-5100 im „Digitize“-Modus gut digitalisieren und dienen in dieser Arbeit nur zur Veranschaulichung.

### 3.4.5.2 Kollodiale Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen basiert auf den Prinzipien, die bei der Proteinbestimmung durch Bradford hinreichend erklärt sind.

Nach dem Gellauf wird das zu färbende Gel für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung (40 % (v/v) Etanol, 10 % (v/v) Essigsäure) getaucht und anschließend für 2 x 20 Minuten in Milli-Q gewaschen. Anschließend erfolgt eine Inkubation in Coomassie-Färbelösung von mindestens 12 h. Zum Entfärben des Gels wird das Gel mehrmals in einer Mischung aus 1 % (v/v) Essigsäure und 20 % (v/v) Methanol gewaschen und die Färbeschale gewechselt. Die Coomassiefärbung wurde nach Färbung der Gele mittels Flamingo benutzt, um einzelne Spots auszuschneiden und zu identifizieren.

### **3.4.5.3 Flamingo<sup>®</sup>-Färbung**

Bei der Färbung von Gelen mittels Flamingo<sup>®</sup> handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Proteinfärbemethode der Firma Bio-Rad. Die genaue Zusammensetzung des Produkts ist nicht verfügbar.

Das Protokoll dieser Färbung ist dem der Coomassiefärbung ähnlich. Nach mindestens zwei Stunden Fixierung wurde das Gel für mindestens drei Stunden in der Färbelösung inkubiert, um es anschließend zu scannen. Weitere Waschschriffe sind nicht erforderlich. Bei ausreichender Proteinmenge ist es möglich, das Gel anschließend mit anderen Färbemethoden (z.B. Coomassie) zu visualisieren.

Gele, die mit Flamingo<sup>®</sup> gefärbt wurden, lassen sich entweder mittels der 473 nm oder der 532 nm Laserlinie bei mittlerer Sensitivität (PMT 1 400-600 V) digitalisieren.

### **3.4.6 Digitalisierung der Gele**

Mit Hilfe eines Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laser-Scanners erfolgte die Digitalisierung der Gele. Dieses modular aufgebaute System ist mit vier Laserlinien (473 nm, 532 nm, 635 nm und 650 nm) und zwei Detektoren versehen. Über die Spannung (250 V – 1000 V) der Photomultiplier (PMT 1 und PMT 2), allerdings nicht über die Abstrahlleistung der Laserlinien, wird die Empfindlichkeit des Systems variiert. Der Photomultiplier des zweiten Kanals besitzt hierbei eine erhöhte Empfindlichkeit im langwelligeren, roten Bereich.

Richtungsweisend für die Einstellung der Spannung der PMTs war die jeweilige Intensität der Gele. Um ein gutes Signal- zu Rauschverhältnis (S/N-Ratio) zu erhalten, ist es wichtig, die Spannung so gering wie möglich zu wählen. Bei Übersättigung des Signals werden die betroffenen Pixel in der Software rot eingefärbt und das resultierende Bild ist in diesem Falle für eine quantitative Betrachtung nicht mehr verwendbar. Hier muss letzten Endes die Spannung herabgesetzt und der Lesevorgang wiederholt werden.

Eine Spannung von 400 – 500 V für beide Kanäle reichte aus, um eine gute Intensität zu erzielen.

Es wurde mit einer Auflösung von 50 µm/Pixel in 16-bit Farbtiefe gescannt und für qualitative Analysen das TIFF-Format gewählt.

### 3.4.7 Statistische Auswertung der Gele

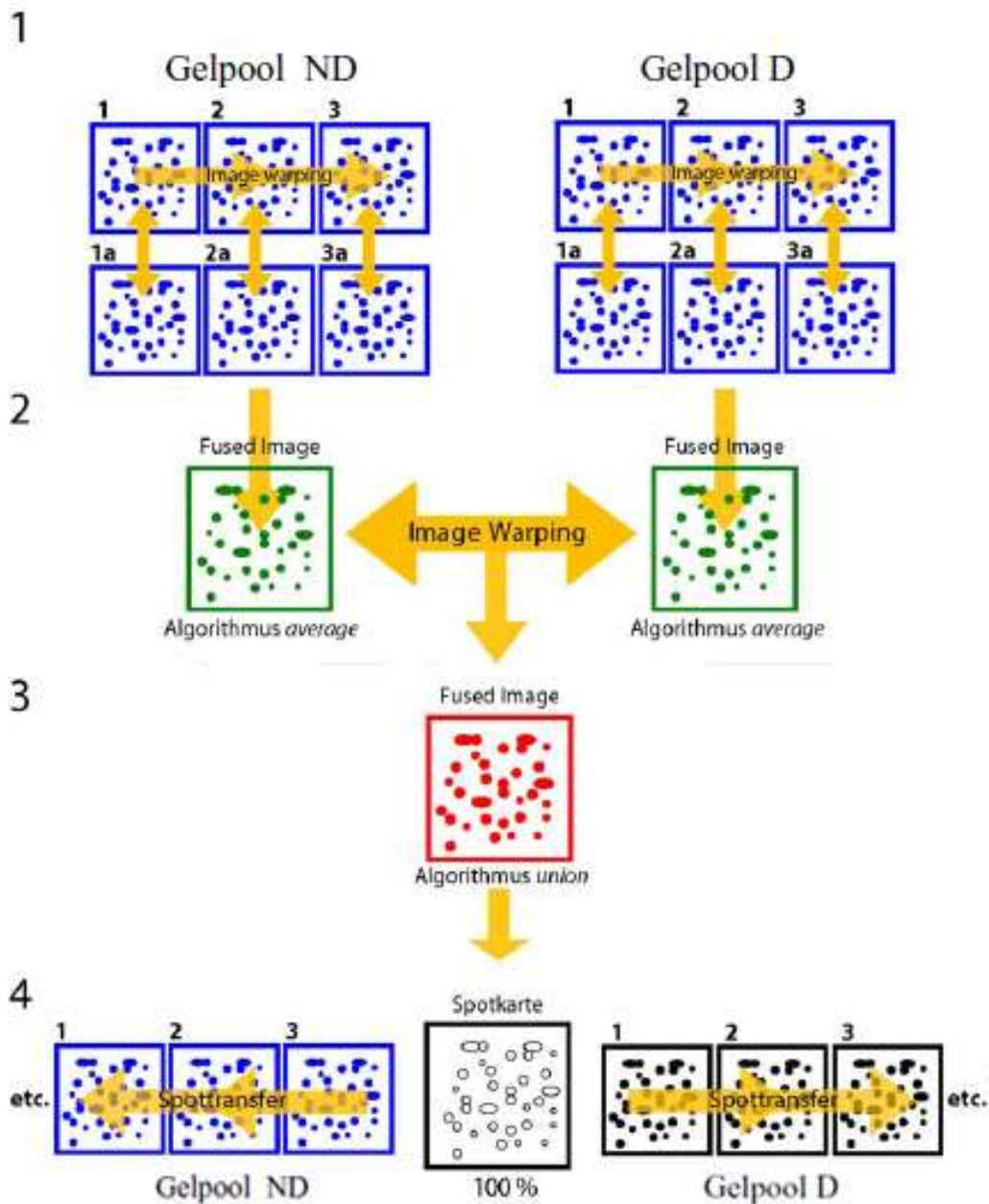
Um die Gele auszuwerten, wurde die Software Delta2D der Decodon AG in der Version 3.4 verwendet. Hierfür waren nur Gele zulässig, die nicht digital nachbearbeitet wurden.

Nur die Funktionen wie Spiegeln, Beschneiden und das Drehen um 90°, 180° und 270° sind zulässig. Eine korrekte Ausrichtung der Bilder schon während des Scannvorgangs ist empfehlenswert.

Die Analyse der Gele beginnt mit dem Scannen. Dabei werden den einzelnen Bildern die jeweiligen Attribute Probennummer, Gelnummer und Farbkanal zugeordnet.

Das Vorgehen der quantitativen Auswertung von 2D-Gelen ist in Abbildung 2 dargestellt, welche sich an dem *consensus spot pattern* - Algorithmus orientiert (Luhn et al. 2003, Berth et al. 2007) der gegenüber der *separate spot detection* deutlich mehr Expressionsunterschiede in deutlich kürzerer Zeit ermöglicht (Eravci et al. 2007). Die Auswertung unterteilt sich in fünf Schritte, welche im Folgenden im Detail erläutert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinspots aus 2D-Gelen ausgewertet, deren Visualisierung durch Flamingo® pink erfolgte. Eine Anfärbung durch Flamingo® hat im Vergleich zur kolloidalen Coomassiefärbung eine deutlich bessere Signaldynamik.



**Abbildung 2:** Gelauswertungsstrategie von Flamingo®-gefärbten Gelen. (1) Gele werden durch *image warping* einander angeglichen (2) Erstellung der Mastergele (*average*) der beiden Patientengruppen und Angleichung (3) Erstellung einer *proteome map* durch *image fusion* (*union*) und (4) Spottransfer der in der *proteome map* festgelegten Spotgrenzen (Modifiziert nach Streich 2009, S. 37)

- Die Positionsunterschiede der Spots werden durch sog. *image warping* ausgeglichen, welches durch das Setzen sog. *match-vectors* geschieht. Diese quantifizieren die Positionsunterschiede der Spots. Die Informationen, die aus diesem Schritt gewonnen werden, werden benutzt, um ein *Mastergel* zu erstellen und den *consensus spot pattern* zu übertragen.



2. Die Bilder werden übereinander gelegt und daraus ein artifizielles Mastergel durch Bildfusionierung erzeugt. Als Fusionsalgorithmus wird hierfür die Funktion „union“ benutzt, wodurch ein Mastergel entsteht, welches sämtliche Spots und Intensitäten der Einzelgele beinhaltet. Dieses Gel soll keine quantitative Aussage besitzen. Aus diesem Grund kann es durch wiederholte Hintergrundsreduzierung und Farbraumnormierung digital verbessert werden.
3. Mit Hilfe des artifiziiellen Mastergels wird eine Spotkarte (*Proteome Map*) erstellt. Hierbei werden auf diesem Gel nur die Spotumrisse festgelegt, die sich aus den Parametern Hintergrund, mittlere Spotgröße und Sensitivität errechnen. Es wird festgelegt, ab welcher Stärke des Graustufenübergangs ein Spot erkannt wird. Durch die Parameter „Sensitivität“ und „Hintergrund“ kann dieser Faktor beeinflusst werden. Zur besseren Trennung von Spotclustern wird der Parameter „mittlere Spotgröße“ benutzt.
4. Die Spotkarte des Mastergels wird auf alle anderen Gele übertragen. Durch das Setzen des *Match Vectors* besteht die Garantie, dass das *consensus pattern* auf die richtige Position der anderen Gele übertragen wird. Anhand der Rohdaten jedes einzelnen Gels (Interner Standard, Probe, Kontrolle) werden die Intensitäten der Spots errechnet, jeweils addiert und auf 100 % normiert. Aus diesem Grund erfolgt die Angabe der Spotintensitäten als prozentualer Anteil und nicht als gemittelter Graustufenwert.
5. Die auf 100 % normierten Intensitäten der Probe und der Kontrolle werden mit den Intensitäten des Internen Standards verrechnet.

Um die Regulationsunterschiede und deren statistische Signifikanz darzustellen, werden für jeden Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und ein T-Test berechnet.

Die Expression eines Proteins gilt als signifikant geregelt, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2, was für eine Hochregulierung dieses Proteins spricht, oder einen Wert von 0,5 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von  $p < 0,05$  ergibt.

### 3.4.8 Massenspektrometrie

#### 3.4.8.1 Gewinnung der Spektren

Die zu identifizierenden Proteine müssen aus dem 2D-Gelen punktuell genau ausgeschnitten werden. Zu diesem Zweck wurde eine Pipettenspitze benutzt, deren Spitze mit einem Skalpell so abgeschnitten wurde, dass die vordere Öffnung einen Durchmesser von 2 mm besaß.

Die ausgeschnittenen Gelfragmente mit den darin enthaltenden zu identifizierenden Proteinspots, wurden anschließend mit destilliertem Wasser für 15 min gewaschen. Anschließend wurde weiter vorgegangen, wie es bei Dihazi et al. beschrieben wurde (Dihazi et al. 2005). Es wurden in dieser Arbeit nur Proteinspots aus Gelen bearbeitet, welche mittels kolloidalem Coomassie angefärbt wurden.

Die Entfärbung der Gelstücke wurde durch dreimaliges abwechselndes Waschen mit 50 %igem ACN und 100 mM Ammonium Bikarbonat für je 5 min erreicht. Nach Entwässerung der Spots mittels ACN für 15 min, wurden die entfärbten Gelstücke anschließend durch eine Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet.

Daraufhin wurden die Gelspots für den Verdau mittels 40 µl Trypsin (10 ng/µl in 100mM Ammonium Bikarbonat) rehydriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss darauf erfolgte die Extraktion mittels 15µl Extraktionslösung (60 % (v/v) und 0,1 % (v/v) TFA).

Die Peptidproben wurden mittels Matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic Säure) auf einem MALDI-Target aus Edelstahl co-kristallisiert, indem 1µl der Matrix und 1 µl der Probe auf das Target aufgetragen und vermischt wurden.

Ein Voyager-DE-STR Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems wurde benutzt, um die verdauten und gespotteten Peptide zu messen und eine Peptidmassenkarte zu generieren. Es wurde der *delayed reflector mode* angewandt mit einer zunehmenden Spannung von 20 kV.

Alle Proben wurden extern mittels einer Mischung hochreiner Peptide mit bekannten Massen, welche aus des-Arg-bradykinin ( $[M + H]^+$  904.46), angiotensin I ( $[M + H]^+$  1296.68), Glu<sup>1</sup>-fibrinopeptide B ( $[M + H]^+$  1570.67), ACTH-(1–17) ( $[M + H]^+$  2093.08) und ACTH-(18–39) ( $[M + H]^+$  2465.19) bestand, kalibriert und die resultierenden Massenspektren wiederum intern mit Trypsin-Autolyseprodukten ( $m/z$  842.50 and  $m/z$  2211.10) kalibriert. Die monoisotopischen Peptide wurden bestimmt und anschließend für den Mascot Datenbankabgleich benutzt (Dihazi et al. 2005).

### 3.4.8.2 Datenbankabgleich

Mit den Massen der Peptide erfolgte mit Hilfe des Programms *Mascot peptide fingerprint*, angeboten von Matrix Science (Oxford, UK, [www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) ein Datenbankabgleich mit der Swiss-Prot Proteindatenbank (Perkins et al. 1999).

Eine Datenbanksuche wurde so durchgeführt, dass nach der Identifikation jeder Treffer optisch überprüft wurde, um so viel Spektralinformation wie möglich abzugleichen.

Die Qualitätskriterien enthielten eine optimierte Massengenauigkeit (~ 50 ppm), eine minimale Massenabweichung (im mDa-Bereich), eine maximierte *sequence coverage* und die höchstmögliche Wahrscheinlichkeit, dass der Score zugeteilt zum identifizierten Protein zugeteilt wurde (Dihazi et al. 2005).

### 3.4.9 Peptid-Sequenzanalyse

Um die Daten, welche man durch die *mass finger print*-Analyse erhalten hat, zu bestätigen und weiter aufzuwerten, wurden einige Proben der Peptid-Sequenzanalyse unterzogen. Nach dem Gel-Verdau wurden die extrahierten Peptide in 0,1 %iger Ameisensäure gelöst. 1 µl der Probe wurde mittels eines CapLC autosampler (automatische Probengeber) der Firma Waters auf einen Voräulenaufsatz (CapLC precolumn cartridge), einen C18 pepMap (300 µm x 5 mm, 5-µm Partikelgröße) und weiter aufgeteilt durch eine C18 pepMap 100 nano-Series TM (75 µm x 15 cm, 3-µm Partikelgröße) analytische Säule der Firma LC Packings. Die mobile Phase bestand aus der Lösung A (5 % ACN in 0,1 % Ameisensäure) und Lösung B (95 % ACN in 0,1 % Ameisensäure). Die gesamte Probenlaufzeit betrug 60 min.

Der erste Schritt beinhaltet das Injizieren der Probe auf die Vorsäule und Waschen für 5 min mit 0,1 %iger Ameisensäure (30 µl). Daraufhin folgte ein Auswaschungsschritt mit einem exponentiellen Gradienten, welcher mit einer 10 %igen Verdünnung der Lösung B begann und bei einer 95 % igen Verdünnung endete. Nach 50 min wurde die Flussrate pro Zeiteinheit durch Flusswiderstände von 5 µl/min Pumpstärke auf 0,25 µl/min runterreguliert.

Die Vorsäule wurde mittels 0,1 % Ameisensäure (30 µl/min) für 5 min re-äquilibriert.

Die Nanoelektrospraynadel wurde auf 2 kV und die Quelltemperatur bei 40 Grad Celsius gehalten. Nach der chromatographischen Auftrennung wurde die Peptidsequenzierung mit Hilfe des Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) Massenspektrometer durchgeführt, welcher bestückt ist mit einer Nano Flow Z-spray Quelle im *positive ion mode*. Mehrfach geladene Peptidvorläufer-Ionen wurden automatisch durch Quadropols markiert

und ausgewählt und in den Hexapol-Kollisionszellen fragmentiert. Deren Fragmentmuster wurden durch die time-of-flight analysiert. Die Datenerfassung wurde mit Hilfe der MassLynx-Software (Version 4.0) durchgeführt. Die Aufschlüsselung und Deisotopierung der Rohdaten erfolgte durch den Max Ent™ lite Algorithmus. Mit den weiterverarbeiteten Daten erfolgte mit dem Mascot Suchprogramm ein Datenbankabgleich mit der Datenbank der MSDB und Swiss-Prot, wobei man eine Massetoleranz von 50 ppm und Fragmenttoleranz von 100 millimass Einheiten benutzte (Dihazi et al. 2005). In dieser Arbeit wurden im Speziellen die beiden FABP L-FABP und H-FABP und stichpunktartig weitere Proteine mit Hilfe der Peptid-Sequenzanalyse untersucht, um die Identifikationsergebnisse weiter zu validieren.

### 3.4.10 Bestätigung der Ergebnisse via Dot Blot

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Protein Dot Blot - Methode, eine methodische Vereinfachung der Western blot - Analyse benutzt. Hierdurch lassen sich Proteine semiquantitativ in einer Lösung nachweisen. Im Gegensatz zur Western blot - Analyse werden die Proteinproben nicht auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, sondern, wie in einer Arbeit von Allen und Parsons beschrieben, direkt auf Nitrozellulose aufgetragen (Allen und Parsons 1979). Die einzelnen Schritte zur Erstellung des Dot Blot sind in der Tabelle 11 dargestellt:

**Tabelle 11:** Arbeitsschritte zum Erstellen eines Dot Blots

Schritt	Beschreibung
1	Bestimmung der Proteinmenge jeder Urinprobe
2	Benutzung einer äquivalenten Menge an Probe, um eine Lösung zu preparieren, welche 5 µg in 1µl enthält
3	Durch Nutzen dünner Pipettenspitzen Spotten von 2 µl der Probe auf die Nitrozellulosemembran in der Mitte des Gitternetzes; Minimierung der penetrierten Fläche durch langsames Applizieren
4	Trocknung der Membran bei Raumtemperatur
5	Blockung der freien Bindungsstellen mit Blockungspuffer für 2 h bei 37 °C
6	Inkubation des ersten Antikörpers gelöst in Blockpuffer für 1 h bei 37 °C
7	Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, wie er in 3.2.3 beschrieben ist, für jeweils 5 min
8	Inkubation des zweiten Antikörpers Fluoreszenz-gekoppelt für 2 h im Dunkeln
9	Dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils 10 min
10	Trocknung der Membran
11	Scannen der Membran durch das FLA-5100 im Dunkeln

Die resultierenden Dot Blots wurden mit Hilfe des kostenlosen Programms Image J ausgewertet. Hierbei bestimmte man die Dichte des jeweiligen Spots in einer gleichgroßen,

definierten Fläche. Die Dichteergebnisse der beiden Gruppen wurden anschließend mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten

In der Zeit von Oktober 2006 bis Januar 2008 wurden in der Klinik der Universitätsmedizin Göttingen 120 Patienten in diese Studie aufgenommen, bei denen ein ANV vermutet wurde oder bei denen erhebliche Risiken bestanden im weiteren Verlauf ein dialysepflichtiges ANV entwickeln zu können. Der Zustand von 68 Patienten konnte ohne maschinelle Hilfe gebessert werden, wodurch sie der Nicht-Dialyse-Gruppe (ND) zugeteilt wurden, bei 52 Patienten musste eine Nierenersatztherapie durchgeführt werden, wodurch diese der Gruppe Dialyse (D) zugeordnet wurden. Wie Tabelle 12 zeigt, waren beide Gruppen in ihren Grundmerkmalen vergleichbar.

Es zeigte sich, dass sowohl in der ND-Gruppe als auch in der D-Gruppe mehr männliche Patienten zu finden waren. In der ND-Gruppe lag der Anteil bei 62 %, in der D-Gruppe bei 65 %. Alter (70,3 Jahre im Mittel bei ND; 68,2 Jahre bei D), Größe (170,8 cm bei ND; 170,3 cm bei D), Gewicht (81,4 kg bei ND; 79,9 kg bei D) und BMI (28,0 kg/m<sup>2</sup> bei ND, 27,5 kg/m<sup>2</sup> bei D) waren annähernd ähnlich.

**Tabelle 12:** Merkmale der Patienten beider Gruppen. Bei den deskriptiven Angaben handelt es sich um absolute (relative) Häufigkeiten oder Mittelwert +/- Standardabweichung

Parameter	Gruppe		P
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
<b>Geschlecht</b>			0,8285
männlich	42 (62 %)	34 (65 %)	
weiblich	26 (38 %)	18 (35 %)	
<b>Alter (Jahren)</b>	70,3 ± 1,5	68,2 ± 2,1	0,4040
<b>Größe (cm)</b>	170,8 ± 1,1	170,3 ± 1,3	0,7868
<b>Gewicht (kg)</b>	81,4 ± 2,2	79,9 ± 2,9	0,6791
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,0 ± 0,7	27,5 ± 1,1	0,7403

### 4.1.1 Vorerkrankungen und Formen des akuten Nierenversagens

Patienten der ND-Gruppe litten signifikant häufiger an einer koronaren Herzerkrankung als Patienten der D-Gruppe. Bei den übrigen erfassten Vorerkrankungen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen finden, welches in Tabelle 13 im Detail zusammenfassend zu sehen ist.

**Tabelle 13:** Vorerkrankungen der Patienten

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
<b>Diabetes mellitus</b>			0,4208
Erkrankt	27 (40,3 %)	16 (31,4 %)	
Nicht erkrankt	40 (59,7 %)	35 (68,6 %)	
<b>Art. Hypertonus</b>			0,5165
Erkrankt	50 (75,8 %)	35 (68,6 %)	
Nicht erkrankt	16 (24,2 %)	16 (31,4 %)	
<b>KHK</b>			0,008332
Erkrankt	48 (72,7 %)	24 (47,1 %)	
Nicht erkrankt	18 (27,3 %)	27 (52,9 %)	
<b>KHI</b>			0,1703
Erkrankt	7 (10,6 %)	11 (21,6 %)	
Nicht erkrankt	59 (89,4 %)	40 (78,4 %)	
<b>COPD</b>			0,7464
Erkrankt	14 (21,2 %)	13 (25,5 %)	
Nicht erkrankt	52 (78,8 %)	38 (74,5 %)	
<b>pAVK</b>			0,2689
Erkrankt	7 (10,6 %)	10 (19,6 %)	
Nicht erkrankt	59 (89,4 %)	41 (80,4 %)	
<b>CNI (stadium 2-3)</b>			0,1031
Erkrankt	9 (13,6 %)	14 (27,5 %)	
Nicht erkrankt	57 (86,4 %)	37 (72,5 %)	

Bei näherer Betrachtung des RIFLE-, AKIN- und SAPS II-Score zeigte sich bei den dialysierten Patienten ein signifikant höherer RIFLE- und AKIN-Score als bei den nicht dialysierten Patienten. Der SAPS II-Score hingegen zeigte sich bei den dialysierten Patienten gegenüber den nicht dialysierten Patienten (median 34 vs. 28) erhöht, ohne dabei allerdings eine Signifikanz erkennen zu lassen.

In Bezug auf das akute Nierenversagen litt der größte Teil der ND-Gruppe (95,6 %) und der D-Gruppe (92,3 %) an einem prärenalen Nierenversagen. Intra- und postrenale Nierenversagen spielten praktisch keine Rolle.

Bei genauerer Untersuchung des prärenalen Nierenversagens in beiden Gruppen zeigte sich, dass signifikant mehr Patienten aus der D-Gruppe einen septischen Schock als Ursache für

das Nierenversagen aufwies, wohingegen bei der ND-Gruppe der kardiogene Schock die signifikant häufigste Ursache war. Tabelle 14 gibt die Einzelheiten zusammenfassend wieder.

**Tabelle 14:** Einteilung der Patienten in den AKIN-, RIFLE- und SAPS II-Score und Einteilung des akuten Nierenversagens in seine Subgruppen.

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
<b>AKIN-Score</b>			$< 2.2 \times 10^{-16}$
1	39 (57,4 %)	0 (0,0 %)	
2	20 (29,4 %)	0 (0,0 %)	
3	9 (13,2 %)	52 (100 %)	
<b>RIFLE-Score</b>			0.01213
Nicht durch den Score erfasst	2 (2,9 %)	3 (5,8 %)	
R	7 (10,3 %)	2 (3,8 %)	
I	21 (30,9 %)	6 (11,5 %)	
F	38 (55,9 %)	41 (78,8 %)	
<b>SAPS II-Score</b>	28 (6 - 58)	34 (9 - 72)	0.09613
<b>Art des ANVs</b>			0.1836
Intrarenal	0 (0,0 %)	3 (5,8 %)	
Prärenal	65 (95,6 %)	48 (92,3 %)	
Postrenal	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	
Andere*	2 (2,9 %)	1 (1,9 %)	
Unbekannt**	1 (1,5 %)	0 (0,0 %)	
<b>Subtypen des prä-renalen ANVs</b>			$7.464 \times 10^{-5}$
Hypovolämisch	3 (4,6 %)	1 (2,1 %)	
Kardiogen	48 (73,8 %)	17 (35,4 %)	
Septisch	8 (12,3 %)	24 (50,0 %)	
Andere*	6 (9,2 %)	6 (12,5 %)	

\*Kombination aus verschiedenen Subtypen, \*\* Ursache nicht bekannt

#### 4.1.2 Blut- und Urinparameter

Durch die Blutparameter aus den jeweiligen Blutproben konnten einige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die Werte für Kreatinin ( $2,9 \pm 0,2$  vs.  $2,1 \pm 0,1$  mg/dl), Cystatin C ( $3,0 \pm 0,2$  vs.  $2,1 \pm 0,1$  mg/l) und Harnstoff-N (Median 23,4 vs. 16,8 mg/dl) waren in der D-Gruppe signifikant höher als in der ND-Gruppe, für Natrium (Median 140,0 vs. 142,5 mmol/l) hingegen war der Wert in der ND-Gruppe größer als in der D-Gruppe. Sowohl der maximale Kreatininwert (Median 3,6 vs. 2,4 mg/dl) als auch der Kreatininanstieg (Median 3,6 vs. 2,9 mg/dl) waren signifikant in der D-Gruppe im Vergleich zur ND-Gruppe erhöht. Alle anderen Blutparameter ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen. Zusammenfassend wird dies in den Tabellen 15 a, b und c dargestellt.



**Tabelle 15a:** Standardblutparameter, die bei fast jedem Patienten während eines stationären Aufenthalts bestimmt werden.

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
P-Kreatinin (mg/dl)	68	52	0,0005458
	2,1±0,1	2,9±0,2	
Harnstoff-N (mg/dl)	65	51	0,0002563
	16,8 (0,0-57,4)	23,4 (0,0-68,2)	
P-Kalium (mmol/l)	62	48	0,1136
	4,4 (3,5-6,0)	4,7 (3,5-27,0)	
P-Natrium (mmol/l)	62	48	0,01915
	142,5 (128,0-159,0)	140,0 (1,3-154,0)	
Hämoglobin (g/dl)	68	52	0,9816
	9,9±0,2	9,9±0,3	
Hkt ( %)	68	52	0,8884
	29,8 (21,5-47,8)	29,5 (18,7-47,4)	
Leukozyten (x10 <sup>3</sup> /μl)	67	51	0,4953
	11,6 (4,5-32,2)	12,1 (1,0-71,8)	
P-CRP (mg/l)	24	32	0,4816
	91,1 (1,0 – 350,8)	111,8 (1,0 – 350,8)	

Vergleich der Standardblutparameter zwischen den beiden Gruppen ND und D. Deskriptive Werte sind entweder als Mittel ± SA oder Median (min.-max.) angegeben.

**Tabelle 15b:** Speziell abgenommene Blutparameter

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
Cystatin C (mg/l)	66	48	9.796 x 10 <sup>-6</sup>
	2,1±0,1	3,0±0,2	
IL-1β (pg/l)	67	48	0,5195
	5,0 (5,0 – 7,0)	5,0 (5,0 – 120,0)	
IL-6 (pg/l)	66	50	0,6636
	74,9 (2,8 – 1000,0)	88,0 (2,4 – 1000,0)	
TNF-α-Interleukine (pg/l)	67	46	0,07139
	21,1 (7,0-100,0)	24,4 (8,5-647,0)	
Anti-GBM-Ak (U/ml)	46	35	0,2257
	0,3 (0,0-1,1)	0,2 (0,0-2,5)	
zirkulierende Immunkomplexe (µg/ml)	36	29	0,8017
	1,6 (0,6-6,8)	1,5 (0,6-7,7)	
Komplement C3c (g/l)	67	49	0,5993
	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	
Komplement C4 (g/l)	67	48	0,4349
	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,02	

Vergleich der speziell abgenommenen Blutparameter zwischen den Gruppen ND und D. Deskriptive Werte sind entweder als Mittel ± SA oder Median (min.-max.) angegeben.

**Tabelle 15c:** Angaben zu Minimal- und Maximalwerten des Serum-Kreatinins, sowie Angaben zum Anstieg des Kreatinins im Serum

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
Minimaler Kreatininwert (mg/dl)	51	68	0,01711
	1,0 (0,5 – 3,2)	0,9 (0,5 – 1,0)	
Maximaler Kreatininwert (mg/dl)	52,0	68,0	3,55 x 10 <sup>-9</sup>
	3,6 (1,2 – 4,6)	2,4 (1,1 – 2,8)	
Kreatininanstieg innerhalb von 48 h (mg/dl)	38	66	0,08466
	1,6 (0,0 – 4,8)	1,8 (1,0 – 3,5)	
maximaler Kreatininanstieg (mg/dl)	48	68	0,001327
	3,6 (0,0 – 12,4)	2,9 (1,3 – 3,4)	

Neben den im Blut abgenommenen Parametern wurden ebenso im Urin Parameter bestimmt. Durch den als Mittelstrahl oder steril aus dem Katheter entnommenen Urin konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. So war die tägliche Diurese, unabhängig von Diuretikaapplikation, signifikant höher in der ND-Gruppe (Median 725 vs. 2760 ml/d), die Flüssigkeitsbilanz allerdings höher in der D-Gruppe (1180,0±280,3 vs. 335,0±194,9 ml).

Die Werte für Albumin (Median 70,5 vs. 34,0 mg/l), den Na/Kreatinin- (3,1±0,3 vs. 4,3±0,3 mmol/mg) und K/Kreatinin-Quotienten (Median 1,7 vs. 2,1 mmol/mg) waren signifikant höher in der ND-Gruppe. Tabelle 16 fasst alle ermittelten Urinparameter zusammen.

**Tabelle 16:** Ermittelte Urinparameter, welche aus Mittelstrahlurin oder dem Katheterschlauch bestimmt wurden

Parameter	Gruppe		p
	ND (n = 68)	D (n = 52)	
U-Kreatinin/P-Kreatinin (mg/mg)	68	50	0,8767
	18,2 (5,0 – 27,2)	17,2 (2,2 – 70,5)	
U-Harnstoff-N/Kreatinin (mg/mg)	68	46	0,08841
	45,3 (2,6 – 239,0)	31,4 (11,3 – 195,4)	
U-Kalium/Kreatinin (mmol/mg)	68	46	0,04536
	2,1 (0,3 – 6,5)	1,7 (0,3 – 5,7)	
U-Natrium/Kreatinin (mmol/mg)	68	43	0,003105
	4,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3	
U-Protein/Kreatinin (mg/mg)	68	52	0,05762
	12,9 (1,1-66,0)	18,2 (0,8-653,0)	
U-Albumin (mg/l)	47	44	0,0004598
	34,0 (12,0-681,0)	70,5 (13,0-3200,0)	
U-α1-Mikroglobulin (mg/l)	63	49	0,1005
	33,0 (5,0–196,0)	42,0 (7,0-227,0)	
U-Osmolarität (mosm/kg)	66	43	0,1593
	364,3 ± 9,9	345,3 ± 9,0	
Tägliche Diurese (ml)	65	45	1,966*10 <sup>-5</sup>
	2760 (90-8400)	725 (0,0-6790)	
Flüssigkeitsbilanz (ml)	65	47	0,01524
	335,0±194,9	1180,0±280,3	

Vergleich der U-Parameter zwischen den beiden Gruppen. Deskriptive Werte sind entweder als Mittelwert ± SA oder Median (min-max) angegeben.

### 4.1.3 Logistisches Regressionsmodell

Nach Betrachtung der Signifikanz aller ermittelten Blut- und Urin-Laborwerte wurden die Parameter herausgesucht, welche jeweils die größte Signifikanz zeigten. Die Fähigkeit der ausgewählten Parameter, Patienten der ND- oder der D-Gruppe zuzuordnen, wird in der folgenden Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Fähigkeit der Parameter mit der höchsten Sensitivität aller ermittelten Laborwerte die Patienten den Gruppen ND und D zuzuteilen

Parameter	Sensitivität %	Spezifität %	AUC % (95 %-CI)	Optimaler Cutoff Mean ± SE
Cystatin C (mg/l)	71	65	74 (65-84)	2.4 ± 0.0006
P-Kreatinin (mg/dl)	42	78	70 (60-80)	2.8 ± 0.01
Harnstoff-N (mg/dl)	42	81	70 (60-79)	23.1 ± 0.08
P-Na (mmol/l)	40	58	63 (52-74)	141.9 ± 0.05
U-Na/Kreatinin (mmol/mg)	78	51	70 (60-81)	2.5 ± 0.007
U-Kalium/Kreatinin (mmol/mg)	32	91	61 (51-72)	3.0 ± 0.0009
U-Albumin (mg/l)	61	62	71 (61-82)	63.2 ± 0.7
Flüssigkeitsbilanz	71	50	64 (51-77)	1218.1 ± 1.2
tägliche Diurese (ml/d)	78	70	73 (64-84)	1689.7 ± 0.3

Diese neun Parameter zeigten eine Treffgenauigkeit, die besser war als eine nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Zuordnung (das Konfidenzintervall von den AUCs beinhaltet nicht eine 50 %ige Tefferwahrscheinlichkeit).

U-Albumin, Cystatin C, P-Kreatinin, P-Natrium, Harnstoff-N, U-Na, U-K, die Flüssigkeitsbilanz und die tägliche Diurese wurden in einem logistischen Regressionsmodell kombiniert, in dem dann Cystatin C, U-Na und U-K durch schrittweise variable Selektion entfernt wurden. Dies ergab das folgende Klassifizierungsmuster:

$$\text{Wahrscheinlichkeit (Person in der Dialyse-Gruppe)} = \frac{\exp(x)}{1 + \exp(x)},$$

wo  $x = 10,1 + 0,005 \cdot \text{U-Albumin} + 0,59 \cdot \text{P-Kreatinin} + 0,06 \cdot \text{Harnstoff-N} - 0,0003 \cdot \text{tägliche Diurese} + 0,0008 \cdot \text{Flüssigkeitsbilanz} - 0,098 \cdot \text{P-Na}$  (Modell A). Als optimaler Grenzwert für diese Wahrscheinlichkeitsgleichung wurde 0,61 festgelegt.

Zusätzlich wurde ein alternatives Modell ohne die tägliche Diurese entwickelt (Modell B), welches, nach variabler Selektion, die folgenden Koeffizienten ergab:

$$x = 7,36 + 0,005 \cdot \text{U-Albumin} + 0,59 \cdot \text{P-Kreatinin} + 0,05 \cdot \text{Harnstoff-N} + 0,0009 \cdot \text{Flüssigkeitsbilanz} - 0,086 \cdot \text{P-Na}.$$

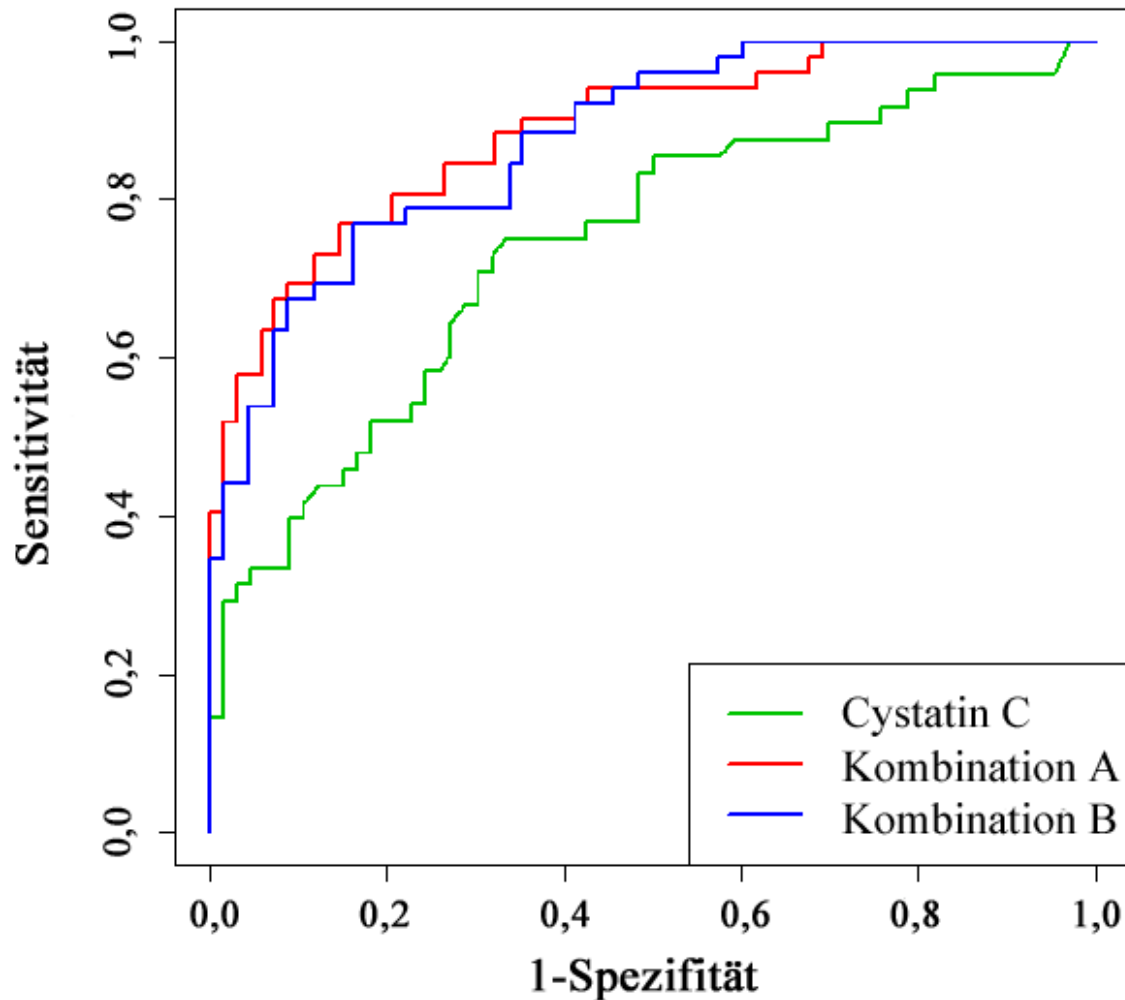
Im Vergleich der beiden Modelle ist der Verlust der Treffgenauigkeit bei Nichtberücksichtigung der täglichen Diurese sehr gering.

Diese Variante des Modells, d.h. ohne die tägliche Diurese, zeigte eine bessere Treffgenauigkeit als der beste einzelne Parameter Cystatin C. Die folgende Tabelle 18 zeigt zusammenfassend alle für die Zuordnung in die beiden Gruppen signifikanten Parameter, wie im vorangehenden Text bereits beschrieben, einschließlich Modell A und B mit ihren AUC-Werten.

**Tabelle 18:** Für die Zuteilung der Patienten signifikante Parameter einschließlich Modell A und B, mit ihrer Sensitivität, Spezifität, AUC und Cutoff

Parameter	Sensitivität %	Spezifität %	AUC % (95 %-CI)	Optimaler Cutoff Mean ± SE
Cystatin C (mg/l)	71	65	74 [65, 84]	2.4 ± 0.0006
P-Kreatinin (mg/dl)	42	78	70 [60, 80]	2.8 ± 0.01
Harnstoff-N (mg/dl)	42	81	70 [60, 79]	23.1 ± 0.08
P-Na (mmol/l)	40	58	63 [52, 74]	141.9 ± 0.05
U-Protein/Kreatinin (mg/mg)	56	65	60 [50, 71]	17.3 ± 0.002
U-Na/Kreatinin (mmol/mg)	78	51	70 [60, 81]	2.5 ± 0.007
U-Kalium/Kreatinin (mmol/mg)	32	91	61 [51, 72]	3.0 ± 0.0009
U-Albumin (mg/l)	61	62	71 [61, 82]	63.2 ± 0.7
Flüssigkeitsbilanz	71	50	64 [51, 77]	1218.1 ± 1.2
Tägliche Diurese(ml/d)	78	70	73 [64, 84]	1689.7 ± 0.3
Modell A	73	83	89 [83, 95]	0.53 ± 0.0004
Modell B	77	82	88 [82, 94]	0.48 ± 0.0002

Mittels ROC-Analyse der Wahrscheinlichkeitsgleichung ohne die tägliche Diurese lag der berechnete optimale Grenzwert für die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie bei 0,48, welches eine Sensitivität von 77 %, einer Spezifität von 82 % und einer Treffgenauigkeit von 88 % ergab. Die folgende Abbildung 6 zeigt die ROC-Kurven im Vergleich.



**Abbildung 6:** ROC-Kurven zu Cystatin C, der Wahrscheinlichkeitsgleichung mit der täglichen Diurese (Modell A) und der Wahrscheinlichkeitsgleichung ohne die tägliche Diurese (Modell B).

## 4.2 Proteinbiochemische Ergebnisse

### 4.2.1 Optimierungsarbeit/-ergebnisse

Wie in Abschnitt 3.4.2 bereits beschrieben, existieren verschiedene Möglichkeiten Proteine aus Probenmaterial, welches in dieser Arbeit der Patientenurin war, zu extrahieren.

Bei der standardmäßig eingesetzten Acetonfällung des Urins zeigte sich eine unerwartete Komplikation bei dem Versuch, mittels der gewonnenen Proteine im Anschluss eine 2D-Gel-Elektrophorese durchzuführen. Wie Abbildung 7 beispielhaft zeigt, stellte sich in einem pH-Bereich von 3-4 und dem Masse-Bereich von 20-150 Dalton eine Kontamination dar, welche sich reproduzierbar in allen weiteren Versuchswiederholungen zeigte.



**Abbildung 7:** 2D-SDS-PAGE aus einer mit Aceton gefälltem Urinprobe. Es wurden jeweils 150 µg Protein aufgetragen und im Bereich pH 3-10 NL fokussiert. Anschließend erfolgte die SDS-Page auf einem Criterion® 12 % Bis-Tris Gel. Die Färbung der Proteine erfolgte mit einer Silberfärbung. Im pH-Bereich von 3-4 und einem Massebereich von 20-150 Dalton ist eine Kontamination unbekannter Herkunft zu erkennen. Diese ist mit einem roten Kreis markiert.

Auf Grund von Problemen bei der Fokussierung und Identifizierung der aus diesen Gelen ausgestanzten Proteine, die sich nicht nur auf den Bereich der Kontamination beschränkten, sondern sich auch auf anderen von der Kontamination nicht betroffenen Regionen des Gels zeigten, wurde nach alternativen Fällungsmethoden bzw. Wegen gesucht, diesen Störfaktor weitestgehend zu minimieren. Es ist nicht bekannt, auf welche Art und Weise diese

Unreinheit die Genauigkeit der Massenspektrometrie bei der Identifizierung von Proteinen stört.

Zum Zwecke der Optimierung wurden sowohl eine Ethanol-fällung als auch eine Chloroform-Methanol-Extraktion einerseits mit Anspruchnahme von Vivaspin®-Konzentratoren zum Waschen und Ankonzentrieren der Proteinpellets andererseits ohne das Benutzen von Konzentratoren erprobt. Alle hier genannten Fällungen wurden, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, angefertigt. Beispielhaft sind Gele zu den einzelnen Fällungsmethoden in den Abbildungen 8 a - c dargestellt.

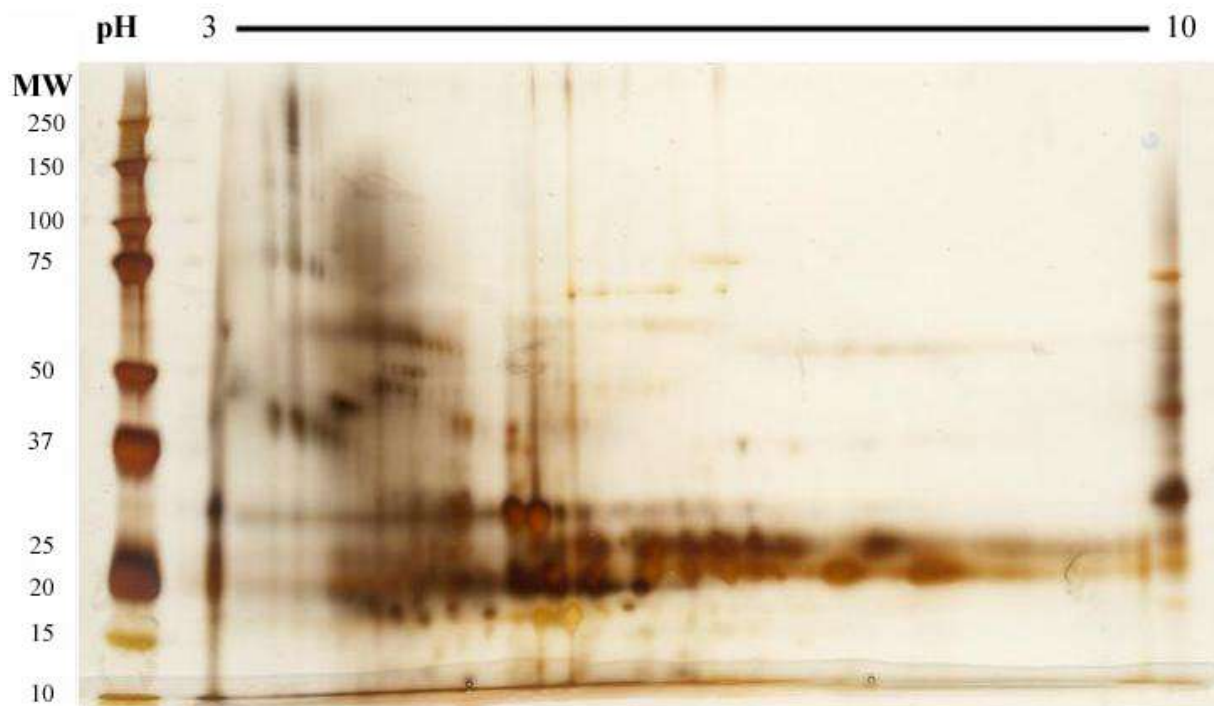


**Abbildung 8a:** 2D-SDS-PAGE aus einer mit Ethanol gefällten Urinprobe. Es wurde jeweils 150 µg Protein aufgetragen und im Bereich pH 3-10 NL fokussiert. Anschließend erfolgte die SDS-Page auf einem Criterion® 12 % Bis-Tris Gel. Die Färbung der Proteine erfolgte mit einer Silberfärbung. Im pH-Bereich von 3-4 und einem Massebereich von 20-150 Dalton ist die Kontamination zwar immer noch zu erkennen, aber deutlich schwächer als bei der Acetonfällung.





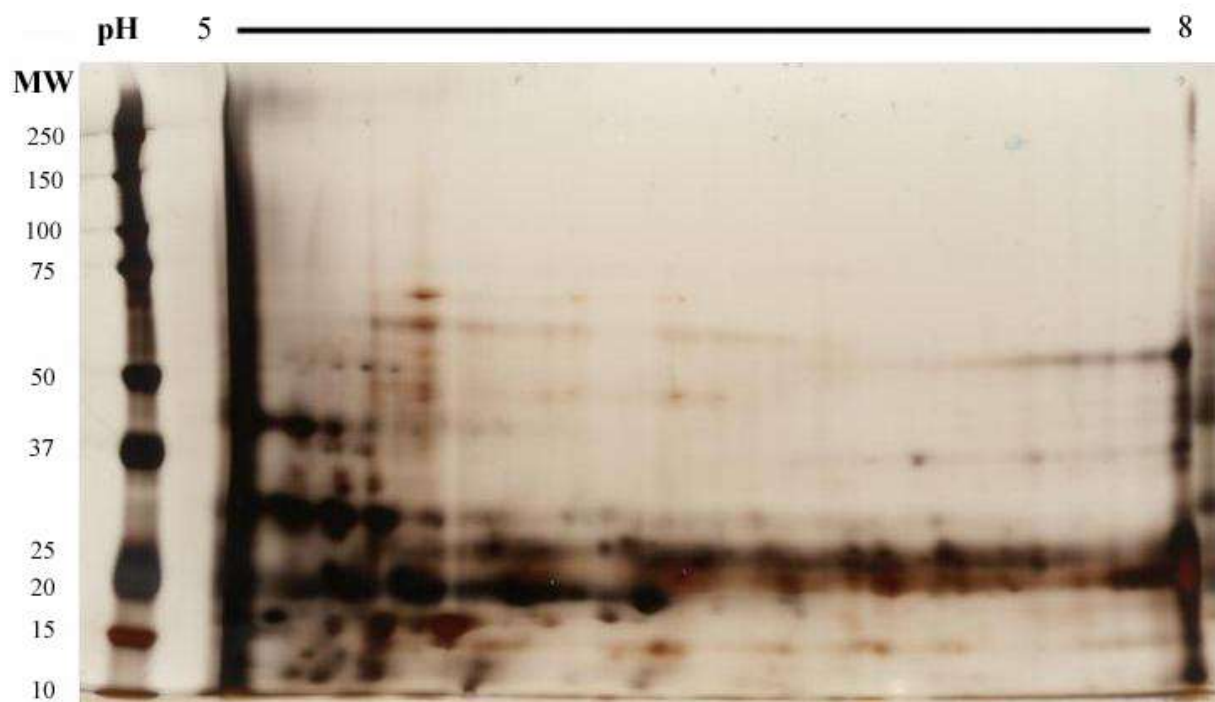
**Abbildung 8b:** 2D-SDS-PAGE aus einer Chloroform-Methanol-Extraktion gefällten Urinprobe, welche vorher mittels Vivaspin®-Konzentratoren gewaschen und ankonzentriert wurde. Es wurde ebenso wie die anderen Gele vorbereitet und gefärbt. Deutlich ist eine Intensitätsminderung der Kontamination zur Aceton- bzw. Ethanol-fällung zu erkennen.



**Abbildung 8c:** 2D-SDS-PAGE aus einer Chloroform-Methanol-Extraktion gefällten Urinprobe ohne vorherige Konzentratoranwendung. Es wurde ebenso wie die anderen Gele vorbereitet und gefärbt. Große Unterschiede im Vergleich zu den mit den Vivaspin®-Konzentratoren aufbereiteten Proben sind nicht zu erkennen.

Auf den Abbildungen ist klar zu erkennen, dass die Intensität der Kontamination mit der Ethanol-fällung, deutlich aber mit der Chloroform-Methanol-Extraktion abnimmt. Hierbei machte es kaum einen Unterschied, ob die Proben vorher mit einem Vivaspin®-Konzentrator aufbereitet, d.h. gewaschen und ankonzentriert wurden, oder nicht.

Bei der Chloroform-Methanol-Extraktion, egal ob nun mit oder ohne Konzentrator, konnten viel bessere Identifikationsergebnisse als bei der Acetonfällung aufgezeigt werden. Trotz allem gab es weiterhin Proteine, die gar nicht oder nur mit einer sehr geringen Signifikanzgrenze identifiziert werden konnten. Da sich die Mehrheit der Urinproteine in dem pH-Bereich 5-8 befand, wurde zur weiteren Optimierung anstatt eines pH 3-10 IPG-Streifens ein IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 5-8 verwendet. Als Fällungsmethode wurde die Chloroform-Methanol-Extraktion ohne vorherige Konzentrator-Aufbereitung gewählt. Einerseits zeigte die Chloroform-Methanol-Extraktion gegenüber den anderen Fällungsarten, wie im vorherigen Text bereits beschrieben, ein besseres Bild- bzw. Identifikationsergebnis, andererseits bestand die Gefahr, durch die Waschschriffe bei Benutzung von Konzentratoren einen Proteinverlust hervorzurufen, weswegen sich bei ähnlichen Endresultaten gegen einen Gebrauch von Konzentratoren entschieden wurde. Abbildung 9 zeigt beispielhaft ein Gel, welches aus einer Chloroform-Methanol-Extraktion-gefällten Urinprobe ohne vorherige Konzentratoranwendung erstellt wurde.



**Abbildung 9:** 2D-SDS-PAGE aus einer Chloroform-Methanol-Extraktion gefällten Urinprobe ohne vorherige Konzentratoranwendung. Anstatt der vorher benutzten IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 3-10 wurde ein Streifen mit dem pH-Bereich 5-8 benutzt. Es wurde ebenso wie die anderen Gele vorbereitet und gefärbt. Die Kontamination ist nicht mehr zu erkennen.

Auf diesem Gel ist die Kontamination nicht mehr zu erkennen. Auch konnte die Identifizierung von Proteinen, die vorher eine geringe Signifikanzgrenze besaßen, dadurch optimiert werden.

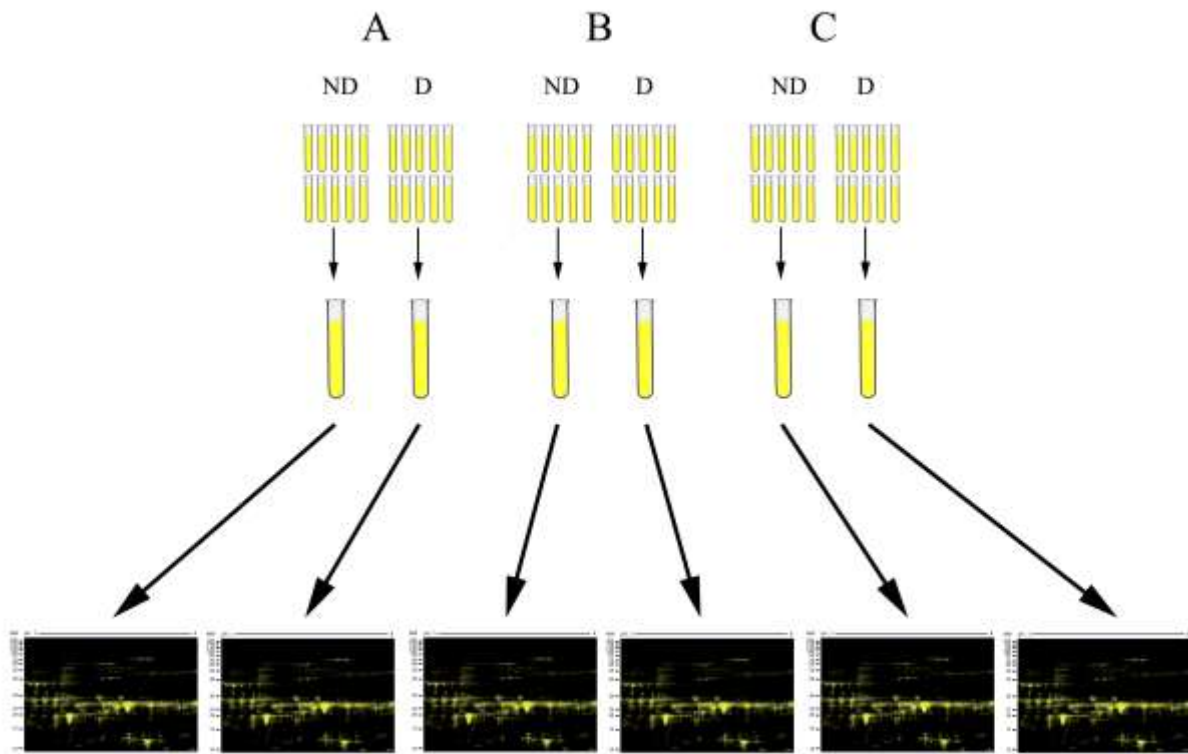
Welchen Ursprungs die Kontamination ist und aus was sie besteht, konnte letztlich im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dies muss Bestandteil späterer Studien sein.

In Folge dieser Optimierungsarbeit wurde der Entschluss gefasst, für alle weiteren Gele eine Chloroform-Methanol-Extraktion ohne Vivaspin®-Konzentratoren für die Proteinaufbereitung zu benutzen und außerdem IPG-Streifen mit dem pH-Bereich von 5-8 zu verwenden. Des Weiteren wurde entschieden, für den weiteren Verlauf Criterion® Tris-HCl Gel 10-20 % Linear Gradienten Fertiggele anstatt der standardmäßig üblichen Criterion XT Bis-Tris 12 % Resolving Gele (beide Bio-Rad, Deutschland) zu benutzen, um den unteren Gewichtsbereich (10-50 Dalton) weiter aufzutrennen. Gründe dafür waren unter anderem eine geringe bzw. fehlende Anzahl an Proteinspots im oberen Molekulargewichtsbereich (100-250 Dalton), sowie eine Verbesserung bzw. Vereinfachung einzelner Spotidentifikationen durch besseres Ausstechen, s. Abschnitt 3.4.8.1.

#### **4.2.2 Patientenproben**

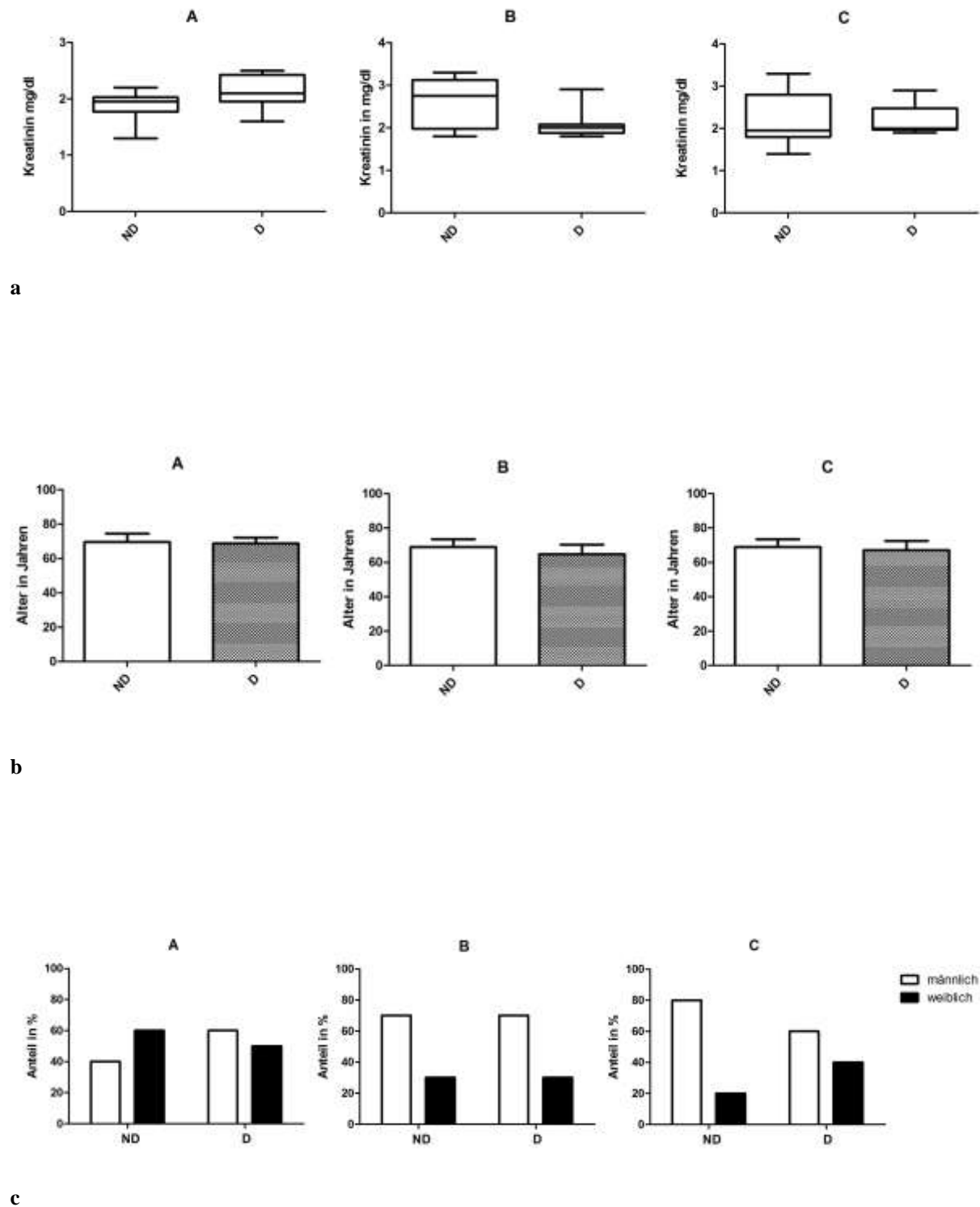
Nach Optimierung der Fällungsmethodik wurden nun 2D-Gele aus dem Urin der Patienten erstellt. Wie in Abschnitt 3.1.3 bereits beschrieben, handelte es sich bei dem Urin ausschließlich um Mittelstrahl- oder Katheterurin. Da die 2D-gelelektrophoretische Untersuchung jeder einzelnen Urinprobe der 120 Patienten zu kostenaufwendig gewesen wäre und um eventuelle Störfaktoren einzelner Patienten zu minimieren, wurden die Urinproben gepoolt. Dies ist ein Standardvorgehen in der Urin-Proteomanalyse und wurde bereits in anderen Studien erfolgreich benutzt (Zhou et al. 2006).

Von je zehn Patienten jeder Gruppe wurde der Urin gepoolt. Um eine möglichst große Breite zu haben, wurden insgesamt je drei Poolgruppen an Hand des Kreatinwertes, welcher annähernd gleich für beide Gruppen sein sollte, wie es Abbildung 11a wiedergibt, aus den zwei Gruppen (ND bzw. D) erstellt. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Poolgruppen als A, B und C bezeichnet. Abbildung 10 stellt das beschriebene Versuchsdesign dar.



**Abbildung 10:** Versuchsdesign zur Bearbeitung der Patientenproben. Zehn Urinproben aus jeder Gruppe (D- und ND-Gruppe) werden an Hand des Kreatinin-Wertes ausgewählt und gepoolt. Es wurden jeweils drei Poolgruppen erstellt, welche die Bezeichnung A, B und C tragen. Die Proteine wurden aus dem Urin der einzelnen Poolgruppen durch eine Chloroform-Methanol-Extraktion ohne Nutzung der Konzentratoren extrahiert. 150 µg Protein wurden auf einem IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 5-8 (BIORAD) fokussiert und auf einem Criterion Tris-HCl Linear Gradienten Gel 10-20 % aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel fixiert und mit Flamingo® (BIORAD) gefärbt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte wie in Abschnitt 3.4.8.1 beschrieben.

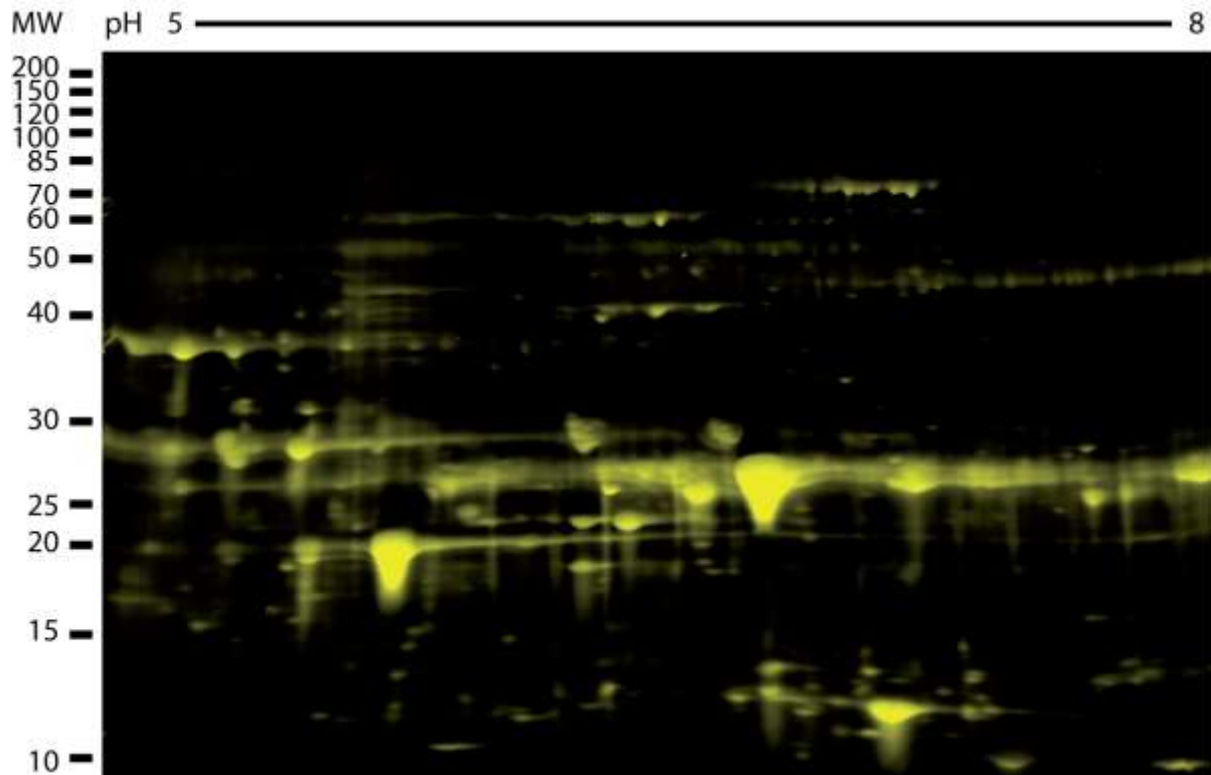
Es zeigte sich, dass die Patienten in Gruppe A zwischen 49 und 81 Jahre, in Gruppe B zwischen 25 und 87 Jahre und in Gruppe C ebenfalls zwischen 25 und 87 Jahre alt waren. Im Mittel waren die Altersgruppen sehr homogen, wie Abbildung 11b verdeutlicht. Die Verteilung zwischen weiblichen und männlichen Patienten innerhalb der einzelnen Pool-Gruppen war sehr unterschiedlich, wie Abbildung 11c zeigt.



**Abbildung 11:** a: Kreatininverteilung der drei untersuchten Urinpools; b: Altersverteilung der drei untersuchten Urinpools; c: Geschlechtsverteilung der drei untersuchten Urinpools.

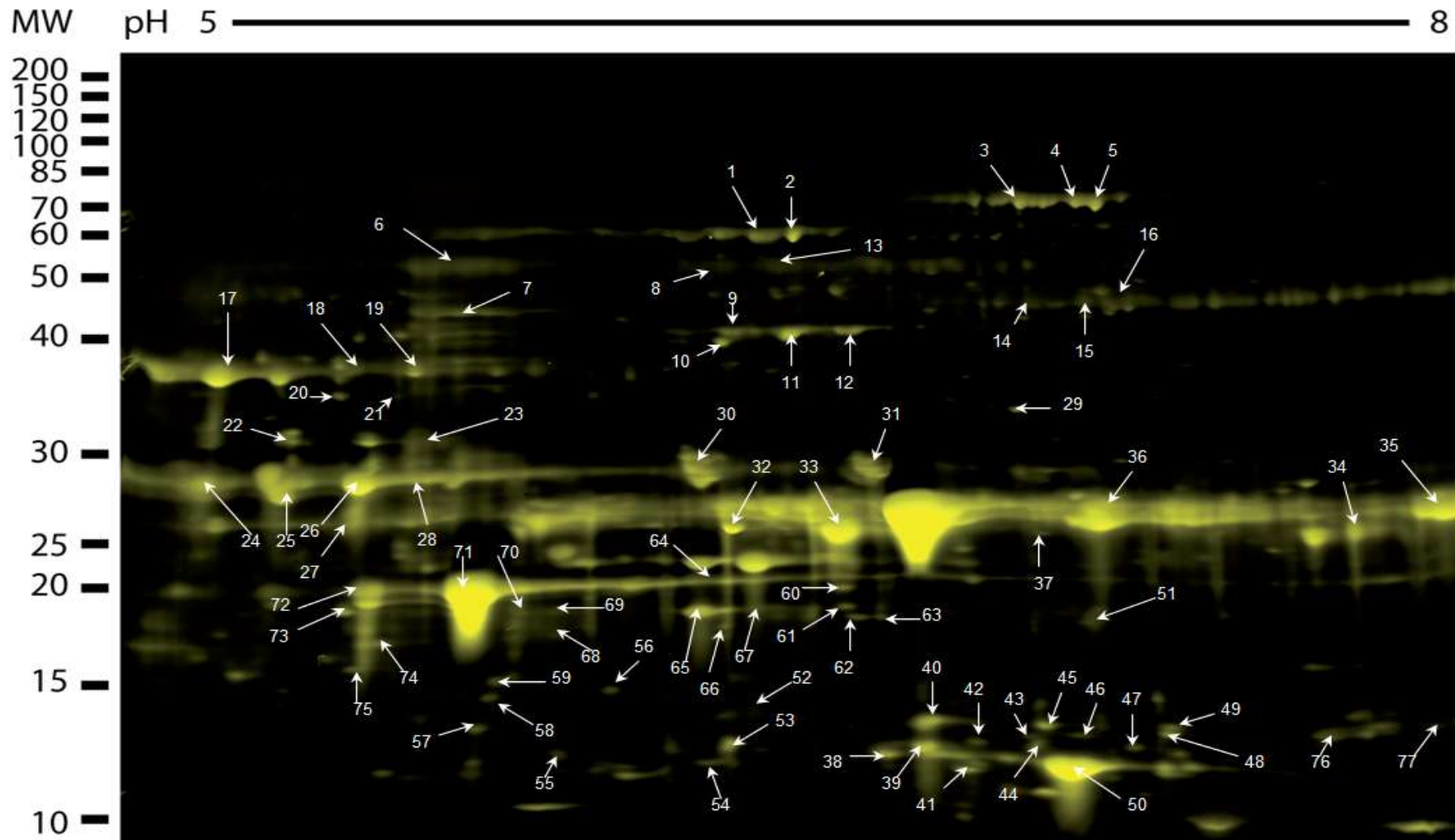
### 4.2.3 Gelelektrophoretische Analyse des Urinproteoms

Die einzelnen Urinproben der Gruppen A bis C wurden wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben aufgearbeitet und die verschiedenen Proteinfällungen der einzelnen Urinproben mittels 2D-SDS-PAGE analysiert. Die 2D-Gele wiesen große Gemeinsamkeiten auf. Daher zeigt Abbildung 12 exemplarisch eines der angefertigten 2D-Gele.



**Abbildung 12:** 2D-SDS-PAGE eines Urin-Gruppen-Pools. Der Pool wurde mittels Chloroform-Ethanol-Fällung vorbereitet. 150 µg Protein wurden auf einem IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 5-8 (BIORAD) fokussiert und auf einem Criterion Tris-HCl Linear Gradienten Gel 10-20 % aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel fixiert und mit Flamingo® (BIORAD) gefärbt.

Die Proteinspots wurden, wie in Abschnitt 3.4.8 beschrieben, durch Delta2D (Decodon AG) quantifiziert und mittels Massenspektrometrie und Datenbanksuche identifiziert. Insgesamt konnten 73 Proteine identifiziert werden. Abbildung 13 zeigt die identifizierten Proteine. Jeder einzelne Proteinspot ist mit einem beschrifteten Pfeil gekennzeichnet. Entsprechend der Beschriftung am Pfeil, sind nähere Informationen zu den einzelnen Spots Tabelle 19 zu entnehmen.



**Abbildung 13:** 2D-SDS-PAGE eines Urin-Gruppen-Pools. 150 µg Protein wurden auf einem IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 5-8 (BIORAD) fokussiert und auf einem Criterion Tris-HCl Linear Gradienten Gel 10-20 % aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel fixiert und mit Flamingo® (BIORAD) gefärbt. Die einzelnen Spots wurden wie in Abschnitt 3.4.8 beschrieben identifiziert. Die einzelnen Spot-Identifikationen können in Tabelle 19 begutachtet werden.

Tabelle 19: Spotidentifikationen zu Abbildung 13

Spot	Genname	Swiss-Prot ID	Proteinbeschreibung	Masse (Da)	PI	MOWSE_SCORE	MS/MS	pep
1	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	88		
2	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	93		
3	TF	TRFE_HUMAN	Serottansferrin	77000	6,70	71		
4	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	86		
5	TF	TRFE_HUMAN	Serottansferrin	77000	6,70	95		
6	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	73		
7	SERPINA	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	204		
8	FH	FUMH_HUMAN	Fumarate hydratate, mitochondrial (Fumarase)	54637	6,99	56		
9	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	68		
10	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	98		
11	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	87		
12	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	64		
13	FTL	FRIL_HUMAN	Ferritin light chain	20007	5,51	56		
14	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	93		
15	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	96		
16	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	81		
17	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	87		
18	SERPINA	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	93		
19	TTR	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15991	5,35	298		
20	APOA4	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,18	94		
21	GSN	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5,72	66		
22	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	56		
23	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	63		
24	AMBP	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	14795	6,13	67		
25	AMBP	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	14795	6,13	128		
26	AMBP	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	14795	6,13	83		
27	AMBP	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	14795	6,13	98		
28	AMBP	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	14795	6,13	101		
29	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	93		
30	A1BG	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-Glykoprotein	54239	5,65	116		
31	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	57		

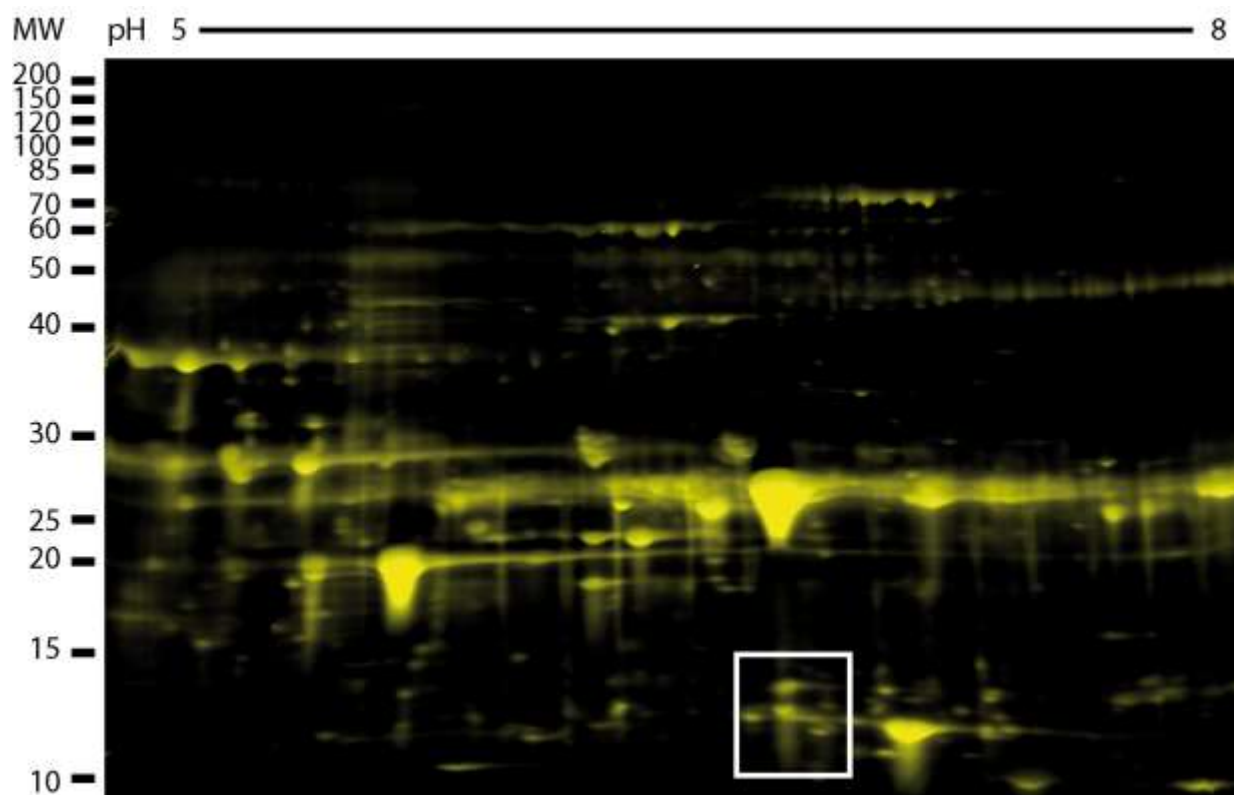


32	VPS13A	VP13A_HUMAN	Vacuolar protein sorting associated like 2B	361872	5,94	56		
33	KNG-1	KNG1_HUMAN	Kinogen-1	71912	6,23	104		
34	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11773	5,58	71		
35	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11773	5,58	83		
36	JSPR1	JSPR1_HUMAN	Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1	32562	6,72	138		
37	VPS13A	VP13A_HUMAN	Vacuolar protein sorting associated like 2B	361872	5,94	84		
38	B2M	B2MG_HUMAN	Beta-2-Microglobulin	13706	5,30	89		
39	CST6	CYTM_HUMAN	Cystatin_M	16500	7,00	55	66	4
40	FABP3	FABPH_HUMAN	Fatty acid-binding protein, heart	14849	6,34	49	107	5
41	B2M	B2MG_HUMAN	Beta-2-Microglobulin	13706	5,30	149	81	2
42	FABP1	FABPL_HUMAN	Fatty acid-binding protein, liver	14199	6,60	152	152	11
43	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	84	84	9
44	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	62	98	7
45	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	157	186	11
46	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	5,58	150	150	3
47	VSIG4	VSIG4_HUMAN	V-set and immunoglobulin domain containing protein4	43959	6,02	134		
48	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	252		
49	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	200	252	9
50	B2M	B2MG_HUMAN	Beta-2-Microglobulin	13706	5,30	153	170	15
51	RBP4	RET4_HUMAN	Retinol binding Protein 4	19118	5,27	168		
52	FABP1	FABPL	Fatty acid-binding protein, liver	14199	6,60	81		
53	ALB	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,67	100		
54	TTR	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15877	5,35	163	163	4
55	SH3BGRL	SH3LI_HUMAN	SH3 domain-binding glutamid acid-rich-like protein	12766	5,21	359	359	8
56	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	5,58	42	42	2
57	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	103		
58	HSPG2	PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparin sulfate proteoglycan core protein	468500	6,74	224	259	6
59	RBP4	RET4_HUMAN	Retinol binding Protein 4	22995	5,27	256		
60	HSPG2	PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparin sulfate proteoglycan core protein	468500	6,74	401		
61	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	222		
62	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	5,58	53		

63	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	80		
64	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	97		
65	IGKC	IGKC_Human	Ig kappa chain C region	11602	5,58	203		
66	RBP4	RET4_HUMAN	Retinol binding Protein 4	22995	5,27	335	129	9
67	RBP4	RET4_HUMAN	Retinol binding Protein 4	22995	5,27	310	303	41
68	RBP4	RET4_HUMAN	Retinol binding Protein 4	22995	5,27	129		
69	IGLC	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	11230	5,32	117		
70	HSPG2	PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparin sulfate proteoglycan core protein	468500	6,74	259		
71	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	5,58	134	401	29
72	IGKC	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	5,58	203		
73	FABP1	FABPL_HUMAN	Fatty acid-binding protein, liver	14199	6,60	112	81	3

Die einzelnen Proteine haben jeweils folgende Informationsspalten: Nummer, den Gennamen, ihre Swiss-Prot-ID, die jeweilige Proteinbeschreibung, ihre Masse, den isoelektrischen Punkt, den MOWSE-Score, den MS/MS Score und den pep-Wert.

Die Auswertung der Gele erfolgte nach dem in den Abschnitten 3.4.7 und 3.4.8 beschriebenen Schema zur Auswertung Flamingo®-gefärbter Gele. Als Kriterium für eine signifikante Regulierung eines Proteins galt ein Quotient der normierten Spotintensitäten der Proben von 2 für eine Hochregulation und 0,6 für eine Herunterregulation bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Es wurden nur Spots betrachtet, die auf allen Gelen identifiziert werden konnten. Besonders im Bereich um den pH-Wert 7 und im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 15 kD, welchen Abbildung 14 zeigt, fielen in der Auswertung der Gele verhältnismäßig viele Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Aus diesem Grund beziehen sich die weiteren Differenzierungen und Untersuchungen auf diesen Bereich.



**Abbildung 14:** 2D-SDS-PAGE eines Urin-Pools. Im pH-Bereich um den pH-Wert 7 und in einem Molekulargewichtsbereich von 10-15 kD zeigten sich besonders viele Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, weswegen dieser Bereich speziell untersucht wurde.

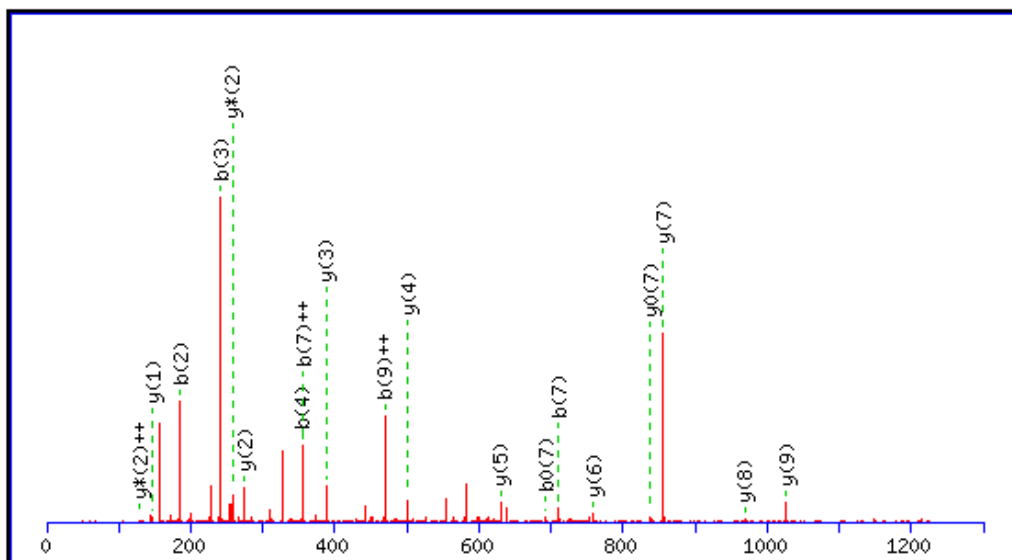
In diesem Bereich konnten Exkretionsunterschiede für zwei Arten des fettsäurebindenden Proteins (*Fatty Acid Binding Protein*) gefunden werden. Diese sind *liver-fatty acid binding protein* (L-FABP; FABP1) und *heart-fatty acid binding protein* (H-FABP; FABP3).

Wie in Abschnitt 3.4.9 bereits beschrieben wurde, wurde die Identifizierung der Proteine teilweise durch eine weitere Validierung mittels der Peptid-Sequenzanalyse ergänzt. Als representative Beispiele für die MS/MS Analyse zeigt Abbildung xxx a und b jeweils das die MS/MS-Spektren zur Auswertung von L-FABP und H-FABP

```

1 MSFSGKYQLQ SQENFEAFMK AIGLPEELIQ KGKDIKGVSE IVQNGKHFKF
51 TITAGSKVIQ NEFTVGEECE LETMTGEKVK TVVQLEGDNK LVTTFKNIKS
101 VTELNGDIIT NTMTLGDIVF KRISKRI
21 - 31      605.8231  1209.6316  1209.6969  -0.0652  0  K.AIGLPEELIQ.G
21 - 31      605.8240  1209.6334  1209.6969  -0.0634  0  K.AIGLPEELIQ.G
21 - 31      605.8244  1209.6342  1209.6969  -0.0626  0  K.AIGLPEELIQ.G
21 - 31      605.8259  1209.6372  1209.6969  -0.0596  0  K.AIGLPEELIQ.G
21 - 31      605.8278  1209.6410  1209.6969  -0.0558  0  K.AIGLPEELIQ.G
21 - 31      605.8317  1209.6488  1209.6969  -0.0480  0  K.AIGLPEELIQ.G
50 - 57      412.6974   823.3802   823.4440  -0.0637  0  K.FTITAGSK.V
50 - 57      412.7120   823.4094   823.4440  -0.0345  0  K.FTITAGSK.V
81 - 90      551.7417  1101.4688  1101.5666  -0.0978  0  K.TVVQLEGDNK.L
81 - 90      551.7627  1101.5108  1101.5666  -0.0558  0  K.TVVQLEGDNK.L
81 - 90      551.7683  1101.5220  1101.5666  -0.0446  0  K.TVVQLEGDNK.L

```



**Monoisotopic mass of neutral peptide  $M_r(\text{calc})$ : 1209.6969**

**Ions Score: 63 Expect: 2.7e-05**

**Matches (Bold Red): 19/84 fragment ions using 38 most intense peaks**

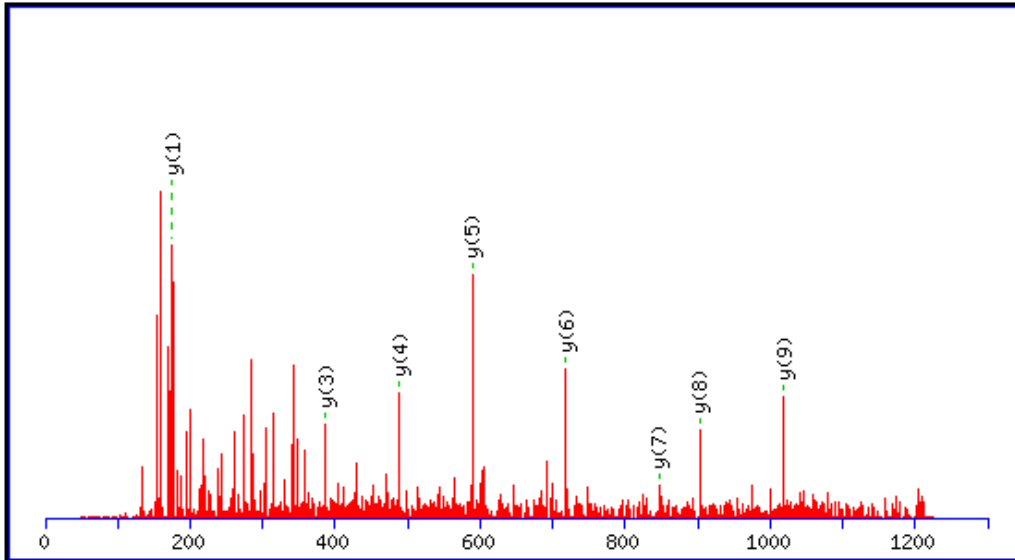
MS/MS Fragmentierung von **AIGLPEELIQ**

a

```

1 MVDAFLGTWK LVDSKNFDDY MKSLGVGFAT RQVASMTKPT TIEKNGDIL
51 TLKTHSTFKN TEISFKLGVE FDETADDRK VKSIVTLDGG KLVHLQKWWDG
101 QETTLVRELI DGKLILTLTH GTAVCTRTYE KEA
16 - 22      474.6630   947.3114   947.3695   -0.0580    0  K.NFDDYMK.S  Oxidation (M)
16 - 22      474.6764   947.3382   947.3695   -0.0312    0  K.NFDDYMK.S  Oxidation (M)
23 - 31      454.2308   906.4470   906.4923   -0.0453    0  K.SLGVGFATR.Q
46 - 53      437.2279   872.4412   872.4967   -0.0555    0  K.NGDILTLK.T
98 - 107     602.7769   1203.5392  1203.5884   -0.0492    0  K.WDQETTLVR.E
114 - 127    519.2661   1554.7765  1554.8552   -0.0787    0  K.LILTLTHGTAVCTR.T
Carbamidomethyl (C)

```



**Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc):** 1203.5884

**Ions Score:** 49 **Expect:** 0.0009

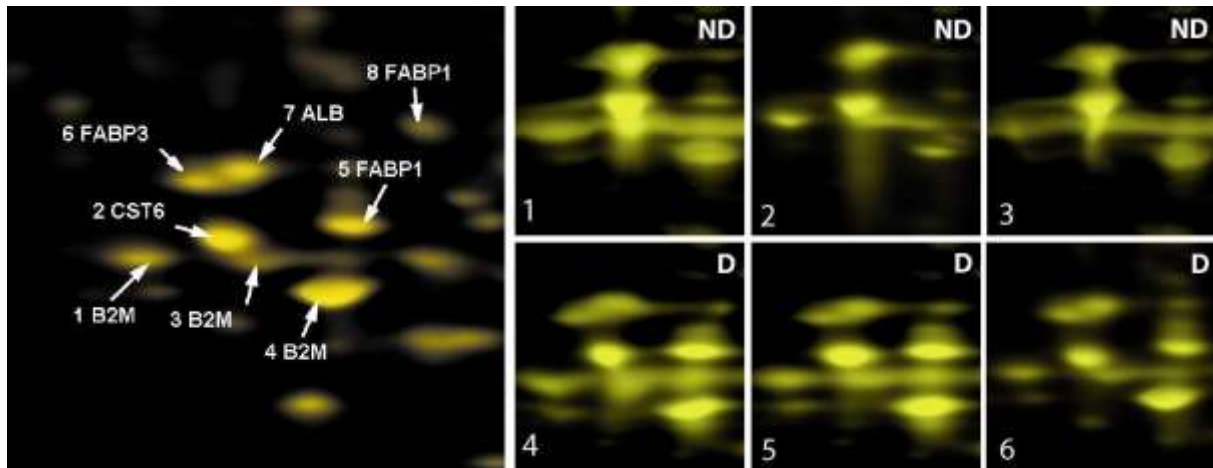
**Matches (Bold Red):** 8/94 fragment ions using 21 most intense peaks

MS/MS Fragmentierung von **WDQETTLVR**

**b**

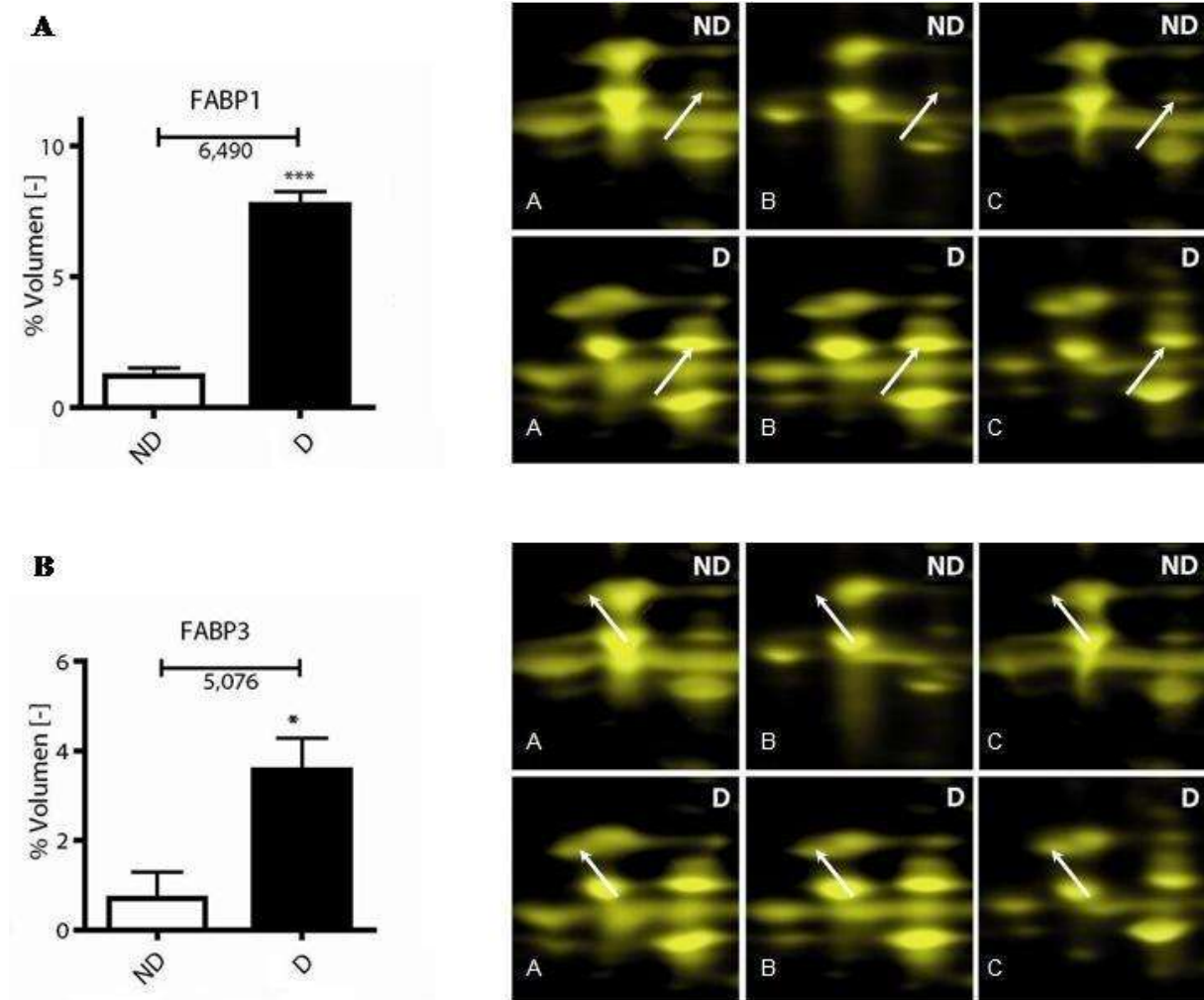
**Abbildung 15:** Representative Beispiele der MS/MS Analyse: a, ein representatives MS/MS Spektrum eines Peptidfragmentes des L-FABPs; b, ein MS/MS Spektrum eines Peptides des H-FABPs

Abbildung 16 zeigt den in Abbildung 14 beschriebenen Gelbereich vergrößert mit den in diesem Bereich identifizierten Proteinen. Auf dem Gel ist der Gennamen des jeweiligen Proteins angegeben. Daneben werden hier die entsprechenden Areale aus den einzelnen 2D-Gelen gezeigt, die jeweils aus dem Urin der Poolgruppen A, B und C hergestellt wurden. Genauere Einzelheiten zu den in Abbildung 15 dargestellten Proteinen lassen sich in Tabelle 19 finden.



**Abbildung 16:** Vergrößerter Bereich im pH-Bereich um den pH-Wert 7 und in einem Molekulargewichtsbereich von 10-15 eines 2D-SDS-Page eines Urinpools. Daneben sind die entsprechenden Bereiche der 2D-Gele der drei Urin-Poolgruppen A, B und C jeweils für die ND- und D-Gruppe dargestellt.

Mittels 2D-SDS-PAGE wurden Exkretionsunterschiede von liver-fatty acid binding protein (L-FABP; FABP1) und heart-fatty acid binding Protein (H-FABP; FABP3) aufgefunden. Diese Unterschiede sind in Abbildung 17 dargestellt. Für das fettsäurebindende Protein FABP1 (L-FABP) ist ein Regulationsunterschied von der ND- auf die D-Gruppe von 6,490 ( $p = 0,001$ ) zu erkennen, wie Abbildung 17 Teil A zeigt. Ebenso, wie in Abbildung 17 Teil B dargestellt, zeigt das andere fettsäurebindende Protein FABP3 (H-FABP) mit einem Wert von 5,076 ( $p = 0,05$ ) eine signifikante Heraufregulation von der ND-Gruppe auf die D-Gruppe.

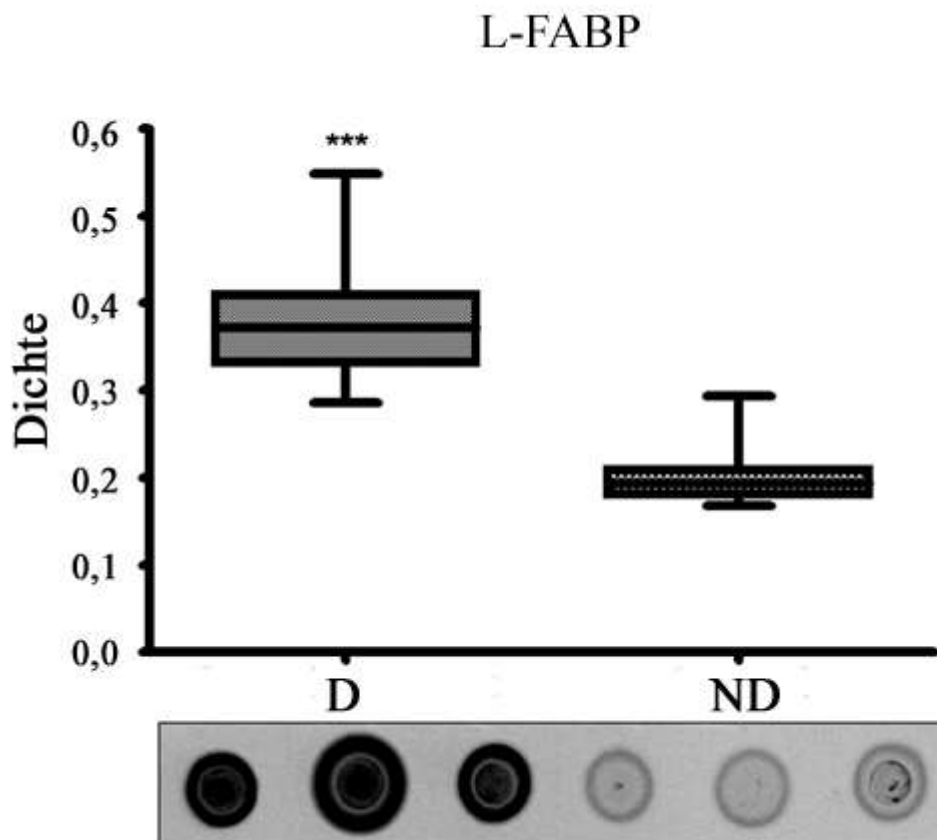


**Abbildung 17:** Darstellung der Exkretionsunterschiede von (A) Liver-Fatty Acid Binding Protein (FABP1; L-FABP) und (B) Heart-Fatty Acid Binding Protein (FABP3; H-FABP). Aufgetragen sind die normierten Spotvolumen der Gruppen ND und D. Die Zahl unter der Proteinbezeichnung bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Exkretionsunterschiede an. Es liegt ein ungepaarter t-Test mit folgender Irrtumswahrscheinlichkeit zu Grunde: (\*)  $p = 0,05$ , (\*\*\*)  $p = 0,001$ . Die Gelregionen mit den jeweils zu Grunde liegenden Spotintensitäten sind rechts neben dem Balkendiagramm zu erkennen. Sie sind einerseits horizontal in die Gruppen ND und D, andererseits vertikal in die Urin-Poolgruppen A, B und C aufgeteilt. Das beschriebene Protein wird jeweils durch den Pfeil gekennzeichnet.

#### 4.2.4 Bestätigung der 2D-SDS-PAGE-Ergebnisse mittels Dot Blot

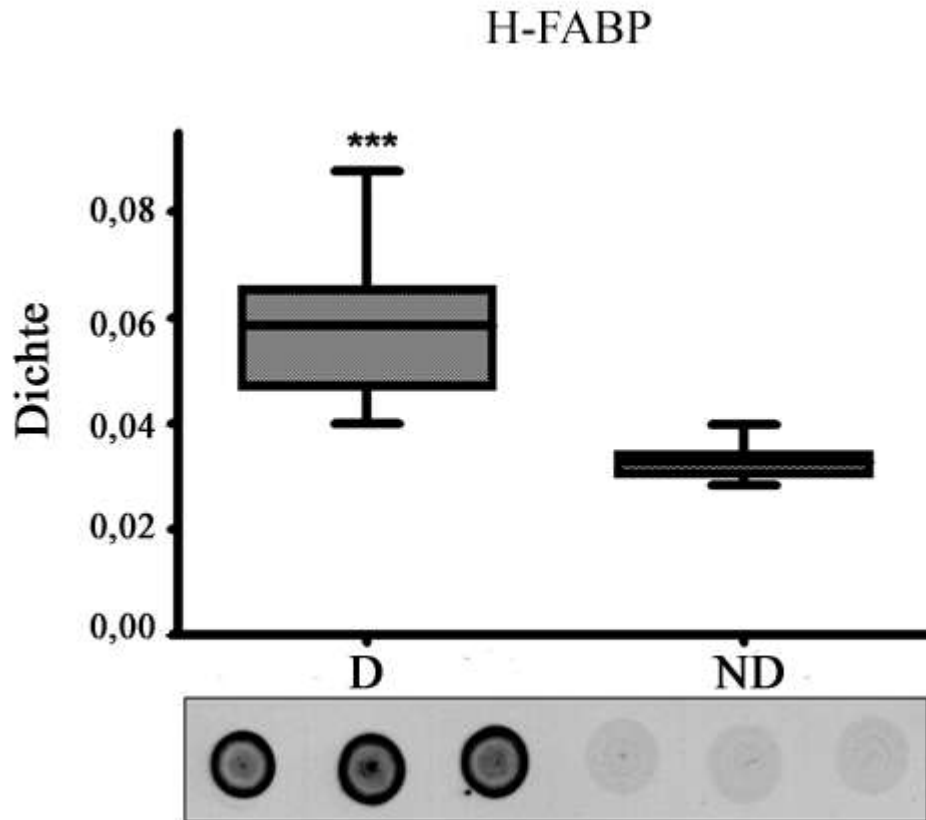
Um die Richtigkeit der 2D-SDS-PAGE-Ergebnisse zu prüfen, wurden randomisiert jeweils 15 Urinproben von Patienten der ND- und D-Gruppe ausgewählt und mittels Dot Blot die Proteinexkretionslevel von L-FABP und H-FABP analysiert. Anschließend wurden die beiden Gruppen ND und D miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18a und b dargestellt. Hier werden die relativen Exkretionsunterschiede in Bezug auf die Dichte der jeweiligen Spots dargestellt.

Die Dot Blot-Daten konnten die Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestätigen. Es konnte ein signifikanter Unterschied der L-FABP- und H-FABP-Exkretion zwischen der ND- und D-Gruppe gefunden werden. Es konnte ein Unterschied mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,001$  gesehen werden.



**Abbildung 18a:** Darstellung der Exkretionsunterschiede von Liver-Fatty Acid Binding Protein (FABP1; L-FABP) via Dot Blot. Auf Nitrozellulosemembranen wurden die normierten Urinproben der Gruppen D und ND aufgetragen. Die Membranen wurden mit Milchpulver blockiert und anschließend mit den beiden Antikörperlösungen inkubiert. Es werden die relativen Exkretionsunterschiede in Bezug auf die Dichte der jeweiligen Spots dargestellt. Es liegt ein Mann-Whitney-Test mit folgender Irrtumswahrscheinlichkeiten zu Grunde: (\*\*\*)  $p = 0,001$ . Die Blots mit den jeweils zu Grunde liegenden Spotintensitäten sind beispielhaft unterhalb des Diagramms zu erkennen.





**Abbildung 18b:** Darstellung der Exkretionsunterschiede von Heart-Fatty Acid Binding Protein (FABP3; H-FABP) via Dot Blot. Auf Nitrozellulosemembranen wurden die normierten Urinproben der Gruppen D und ND aufgetragen. Die Membranen wurden mit Milchpulver blockiert und anschließend mit den beiden Antikörperlösungen inkubiert. Es werden die relativen Exkretionsunterschiede in Bezug auf die Dichte der jeweiligen Spots dargestellt. Es liegt ein Mann-Whitney-Test mit folgender Irrtumswahrscheinlichkeiten zu Grunde: (\*\*\*)  $p = 0,001$ . Die Blots mit den jeweils zu Grunde liegenden Spotintensitäten sind beispielhaft unterhalb des Diagramms zu erkennen.

## 5 Diskussion

Trotz der Wichtigkeit des ANVs gab es eine lange Zeit keinen einheitlichen Konsens bezüglich der diagnostischen Kriterien oder der klinischen Definition (Kellum et al. 2002). Neue Standards für die Diagnose und Klassifizierung eines ANV entstanden erst durch die Einführung der RIFLE- und AKIN-Klassifikationen, wobei weiterhin Unstimmigkeit zur Frage des optimalen Zeitpunkts für den Beginn einer NET herrscht, sei es an Hand von Biomarkern (z.B. Kreatinin oder Harnstoff-N), Flüssigkeitsvolumenstatus oder z.B. an Hand der RIFLE-Kriterien (Gibney et al. 2008).

Die optimale Nutzung der NET spielt eine große Rolle für das Outcome des ANVs. Daneben vermag die Optimierung des renalen Supports mit großer Wahrscheinlichkeit die hohe Sterblichkeit bezüglich dieser akuten Nierenerkrankung zu senken (Uchino et al. 2005, Palevsky 2007).

Es gibt große Variationen in der klinischen praktischen Durchführung der NET (Overberger et al. 2007). Die Bereitstellung einer NET bei Patienten mit ANV ist nicht einheitlich und basiert primär auf Empirismus, lokale institutionelle Praxis und Ressourcen (Mendelssohn et al. 2001, Ricci et al. 2006, Overberger et al. 2007). So haben in der Regel lokale Ressourcen, die Personalbesetzung, Verfügbarkeit der Geräte und das Budget einen großen Einfluss auf den Gebrauch der NET (Gibney et al. 2008).

Ebenso besteht bereits über die Frage, ob eine frühe Dialyse eines Patienten gegenüber einer zu einem späteren Zeitpunkt begonnenen NET vorteilhaft ist, eine kontroverse Diskussion.

Es gibt zahlreiche Studien, die vermuten lassen, dass ein früher Dialysestart die Überlebensrate, Lebensqualität und Senkung der Komplikationen bei Patienten verbessert und dadurch einen Überlebensvorteil in der frühen Dialyse sehen (Bonomini et al. 1986, Tattersall et al. 1995, Liu et al. 2006, Seabra et al. 2008, Bagshaw et al. 2009).

Andererseits liegen ebenso viele Studien vor, die die These vertreten, dass ein zu schneller Beginn einer NET eher schädlich sein könnte (Traynor et al. 2002, Beddhu et al. 2003, Kazmi et al. 2005, Stel et al. 2009, Lassalle et al. 2010).

Es ist in diesem Zusammenhang noch unklar, ob der eventuelle klinische Vorteil eines frühen Beginns der NET einer früheren Beseitigung und Kontrolle urämischer Toxine, einer früheren metabolischen Kontrolle, einer frühzeitigen Prävention und Beherrschung einer Volumenüberladung, einer inflammatorischen Reaktion, einer Kombination aus all diesen genannten Faktoren oder anderen noch nicht bekannten Ursachen zugeordnet werden kann (Seabra et al. 2008). Diesbezüglich sind weitere Studien nötig.

Haupt-Gegenargument für die These, eine NET möglichst früh zu initiieren, ist, dass Patienten, deren Nierenfunktion sich durch eine alleinige konservative Therapie regenerieren würde, unnötigen Risiken ausgesetzt werden (Ostermann und Chang 2009). Infektionen, Elektrolyt- und metabolische Komplikationen, hämodynamische Schwierigkeiten oder einfach nur menschliche Durchführungsfehler seien nur beispielhaft als Risiken einer NET genannt (Palevsky et al. 2005).

Das grundsätzliche Problem dieser Studien ist die fehlende Vergleichsmöglichkeit. Was die einzelnen Studien als „früh“ oder „spät“ bezeichnen, kann zum Teil sehr variieren. So werden in Studien z.B. Harnstoff-N, Serum-Kreatinin oder der Zeitpunkt der Dialyse nach Einweisung auf die Intensivstation als Grenzwert für die Einteilung in die frühe bzw. späte Dialysegruppe benutzt (Gettings et al. 1999, Demirkilic et al. 2004, Elahi et al. 2004, Piccinni et al. 2006). Allerdings ist die Wahl des Kriteriums für den Beginn einer NET nicht unerheblich. So fand die Arbeitsgruppe um Uchino et al. mit Hilfe ihrer prospektiven, multinationalen Kohorten-Studie über kritisch kranke Patienten mit ANV heraus, dass Unterschiede im klinischen Outcome bestanden, nachdem der Zeitpunkt der NET entweder durch den Medianwert von Serum-Kreatinin oder Serum-Harnstoff-N oder der Einweisungszeit auf die Intensivstation bestimmt worden war. An Hand dieser Kriterien wurde der Zeitpunkt in „früh“ und „spät“ eingeteilt (Uchino et al. 2005). Eine späte NET, wie auch immer definiert, war assoziiert mit einer längeren Notwendigkeit des extrakorporalen Supports, eines längeren Aufenthaltes im Krankenhaus und einer schlechteren Wiederherstellung der Nierenfunktion (Uchino et al. 2005, Bagshaw et al. 2009).

Indes sind die Kriterien zur Grenzwertfestlegung selbst nicht unumstritten. So ist die Verwendung sowohl des Serum-Kreatinins, auf den in Abschnitt 5.1 näher eingegangen wird, als auch des Harnstoff-Ns bezüglich der Bestimmung eines ANVs kritisch zu begutachten.

Die Bildung von Harnstoff-N ist nicht konstant. Nach Palevsky et al. gibt es in der Bildungsrate starke Variationen einerseits von Patient zu Patient andererseits auch innerhalb eines Individuums selbst als Ausdruck verschiedener metabolischer Zustände. Ebenso ist die Verteilung im Körper von Harnstoff-N bei Kritisch-Kranken sehr variabel und inkonstant, wodurch sich die Variabilität der Anstiegsrate dieses Stoffes sowohl bei verschiedenen Individuen als auch bei ein und demselben Individuum über eine längere Zeit erklären lässt (Palevsky 2008).

Durch die aufgezeigten Diskussionen und dargestellten Schwierigkeiten bezüglich des richtigen Zeitpunktes einer Nierenersatztherapie sollte ersichtlich sein, dass aktuelle Daten zur

Zeit inadäquat sind, um die Frage der geeigneten Indikation und des optimalen Zeitpunkts des Beginns eines renalen Supports bei ANV zu beantworten (Palevsky 2008).

## 5.1 Einteilung des akuten Nierenversagens

Mit den RIFLE- und AKIN-Kriterien gibt es nun Einteilungen, um das akute Nierenversagen besser zu definieren und identifizieren. Schon in früheren Studien mit zum Teil großen Fallzahlen wurden beide Einteilungen miteinander verglichen (Lopes et al. 2008, Bagshaw et al. 2008a, Ostermann und Chang 2011).

Welche der beiden Klassifikationen sich für spätere Studien und den klinischen Alltag durchsetzen wird, ist abzuwarten. Denn obwohl diese die Definition und Einteilung des akuten Nierenversagens „revolutioniert“ haben, sind sie nicht als kritiklos anzusehen.

Ein großer Kritikpunkt an der RIFLE-Klassifikation ist die Empfehlung, einen Baseline-Kreatininwert mit Hilfe der MDRD-Formel zu berechnen, wenn vorherige Werte nicht zur Verfügung stehen (Delanaye et al. 2007, Joannidis 2007). Zum einen ignoriert diese Methode die Tatsache, dass ein Anteil der Patienten bereits ein vorbestehendes chronisches Nierenversagen hat, wodurch das Auftreten eines ANVs überbewertet werden kann. Zum anderen wurde die MDRD-Formel anfänglich mittels Patienten mit stabiler chronischer Nierenerkrankung hergeleitet. Deren Übertragung auf Patienten mit ANV und einem schnellen Wechsel des Kreatininlevels wurde nie getestet (Ostermann und Chang 2011).

Eine weitere wichtige Einschränkung ist laut Ostermann et al., dass die RIFLE-Klassifikation die NET nicht als eines ihrer Kriterien besitzt mit dem Resultat, dass alle RIFLE-Kategorien bereits dialysierte Patienten enthalten können. So können auf der einen Seite Patienten als Stufe R oder sogar als „kein ANV“ eingestuft sein, wie es der Fall wäre, wenn Patienten trotz geringer Veränderung des Serum-Kreatinin-Levels dialysepflichtig werden. Andererseits können dialysierte Patienten nach einem spät eingeleiteten renalem Support auch in die Klasse F eingeteilt werden, wo dann der Kreatininspiegel eventuell schon stark angestiegen ist (Ostermann und Chang 2011).

Im Gegensatz dazu werden in der AKIN-Klassifikation Patienten, die eine NET erhalten haben, automatisch in den schwersten Grad des ANVs eingestuft, unabhängig vom Kreatininwert (Ostermann und Chang 2011).

Die Unterschiede zwischen den beiden Klassifikationen wurden bereits in Kapitel 1.1.1.2 erläutert. Auch die AKIN-Klassifikation ist kritisch zu betrachten. Diese Einteilung benutzt ein 48 h-Zeitfenster zur Abstufung der einzelnen Schweregrade, um den akuten Charakter des Nierenversagens sicherzustellen. Die Gefahr dieses relativ engen Zeitfensters ist die nicht

korrekte Identifikation von Patienten mit einer langsam progressiven akuten renalen Dysfunktion. Diesbezüglich zeigten Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Ostermann et al., dass etliche Patienten, welche durch die AKIN-Klassifikation als „kein ANV“ eingestuft wurden, einen Serum-Kreatinin Wert von über 1,6 mg/dl hatten, von denen wiederum einige Patienten sogar Werte von über 3 mg/dl zeigten. Auch andere Patienten dieser Studie zeigten einen progressiven Anstieg des Serum-Kreatinins, allerdings nicht in der angegebenen Zeitperiode (Ostermann und Chang 2011). Auf diese Art und Weise wäre ein akutes Nierenversagen bei einigen Patienten nicht erkannt worden.

Beide Klassifikationen, wie auch die konventionelle klinische Diagnostik des akuten Nierenversagens, beruhen zum größten Teil auf der Messung des Serum-Kreatinins. Leider ist das Kreatinin als Indikator für eine akute Funktionsminderung der Niere unzuverlässig (Bellomo et al. 2004a). So variiert der Kreatinin-Spiegel zum einen sehr stark mit Alter, Geschlecht, Muskelmasse, Muskelmetabolismus, Medikamenten und Hydratationsstatus. Zum anderen lässt sich eine Veränderung des Serum-Kreatininspiegels erst bei einer Nierenschädigung von über 50 % feststellen (Devarajan 2007). Auf diese Art kommen große Verzögerungen in der Diagnose eines ANVs zu Stande und dem akuten Geschehen kann nichts im gleichen Maße entgegengesetzt werden.

Aus diesem Grund werden bessere Biomarker als z.B. das Kreatinin, um ein akutes Nierenversagen früher zu identifizieren.

## **5.2 Neue Biomarker für das akute Nierenversagen**

Durch die rasante Entwicklung der Biomarker-Forschung gibt es zahlreiche Anwärter, die in Zukunft die Stellung des Kreatinins einnehmen oder gar ersetzen könnten. Im Folgenden seien nur einige dieser vorgestellt.

Das Cystatin C z.B. scheint als ein endogener GFR Marker eine gute Alternative zum Serum-Kreatinin zu sein. Es ist ein leicht molekular gewichtiges Protein, welches von allen kernhaltigen Zellen produziert wird. Es wird frei glomerulär filtriert und anschließend durch den proximalen Tubulus wieder reabsorbiert und metabolisiert (Waikar et al. 2008). Viele verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass Cystatin C dem Serum-Kreatinin in der frühen Detektion einer reduzierten GFR überlegen ist (Herget-Rosenthal et al. 2004, Herget-Rosenthal et al. 2005, Villa et al. 2005). Weil der Blutspiegel des Cystatin C nicht signifikant durch das Alter, Geschlecht oder die Muskelmasse beeinflusst wird, ist es ein besserer diagnostischer Marker für die glomeruläre Funktion als das Serum-Kreatinin (Parikh und Devarajan 2008). So zeigte die Arbeitsgruppe um Herget-Rosenthal et al. in ihrer Arbeit, dass

ein 50 %iger Anstieg des Serum-Cystatin C ein ANV zwei Tage vor einem Anstieg des Serum-Kreatinins, wie es für eine „R“-Einstufung in der RIFLE Klassifikation gefordert wird, vorhersagen konnte. Die AUC lag zwei Tage vor dem besagten Kreatininanstieg bei 0,82 und einen Tag vor dem Anstieg bei sogar 0,97 (Herget-Rosenthal et al. 2004).

Allerdings ist auch der Serumspiegel des Cystatin C wie von allen zirkulierenden Substanzen nicht nur von der Clearance abhängig, sondern auch von der Produktionsrate und von akuten Veränderungen in der Volumenverteilung (Waikar et al. 2008).

Das neutrophile Gelatinase assoziierte Lipocalin (NGAL) wurde identifiziert als ein 25 kDa großes Protein, welches ursprünglich in spezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen wurde. NGAL ist normalerweise in sehr kleinen Mengen in vielen verschiedenen menschlichen Geweben exprimiert inklusive der Niere, Lunge, des Magens und Kolons. Die Exkretion dieses Proteins wird bei geschädigtem Epithel gesteigert. Es wurde als eines der am frühesten induzierten Proteine in der Niere nach ischämischen oder nephrotoxischen Schädigungen in Tiermodellen identifiziert, welches leicht im Urin und Blut zu finden ist (Mishra et al. 2003, Mishra et al. 2004). Es gibt Studien, die zeigen, dass NGAL eher ein ANV vorhersagen kann als z.B. das Kreatinin (Wagener et al. 2006). In dem Wissen, dass bereits veröffentlichte Arbeiten über NGAL eine geringe Patientenzahl als Grundlage haben, müssen Studien mit größeren Patientenzahlen durchgeführt werden (Parikh und Devarajan 2008).

Ein weiteres Beispiel für einen potentiellen Marker ist das Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1). Dieses ist ein transmembranes Protein, dessen Hochexpression in proximalen Tubuluszellen bei ischämischen und nephrotoxischem ANV tierexperimentell gezeigt wurde (Ichimura et al. 1998). Neuere Studien zeigten das klinische Potential dieses Proteins für die Vorhersage des ANVs (Han et al. 2002, Liangos et al. 2007, Han et al. 2008). Doch werden auch hier bis zum Zeitpunkt der Etablierung weitere Studien benötigt.

Interleukin-18 ist ein weiteres Protein, welches in Zusammenhang mit dem ANV steht. Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches im proximalen Tubulus nach einem akuten Nierenversagen induziert und gespalten wird. Es gibt einige Studien, die über die Vorhersagekraft dieses Proteins bezüglich des ANVs berichten (Parikh et al. 2004, Parikh et al. 2005). Allerdings muss auch hier weitere Forschungsarbeit betrieben werden, um dieses Protein eventuell etablieren zu können.

### 5.3 Ergebnisinterpretation

Mittels 2D-SDS-PAGE wurden in dieser Arbeit Exkretionsunterschiede von liver-fatty acid binding protein (L-FABP; FABP1) und heart-fatty acid binding protein (H-FABP; FABP3) zwischen der ND- und D-Gruppe gefunden. Wie in Abschnitt 4.2.3 bereits beschrieben, ist für das fettsäurebindende Protein FABP1 (L-FABP) ein Regulationsunterschied von der ND- auf die D-Gruppe von 6,490 ( $p = 0,001$ ) und für das andere fettsäurebindende Protein FABP3 (H-FABP) eine signifikante Heraufregulation von der ND-Gruppe auf die D-Gruppe von 5,076 ( $p = 0,05$ ) zu erkennen.

Fettsäurebindende Proteine (FABPs) sind Mitglieder der Superfamilie der lipidbindenden Proteine, welche ein niedriges Molekulargewicht zwischen 14 und 15 kD haben. Die verschiedenen Typen des FABPs können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die einen, welche assoziiert sind mit der Plasmamembran, und die anderen, die intrazellulär bzw. zytoplasmatisch liegen (Glatz und van der Vusse 1996).

Bislang wurden neun verschiedene FABPs mit gewebsspezifischer Verteilung identifiziert, benannt nach dem Gewebe, in dem sie das erste Mal identifiziert worden sind (Pelsers 2008). So wurden gewebespezifische Formen in größeren Mengen in der Leber (L-Typ), im Intestinaltrakt (I-Typ), im Muskel und Herzmuskel (H-Typ), im Fettgewebe (A-Typ (aus dem englischen adipocyte)), in der Epidermis (E-Typ), im Gehirn (B-Typ (aus dem englischen brain)), im Myelengewebe (M-Typ) und in der Testis (T-Typ) gefunden (Chmurzynska 2006, Negishi et al. 2007). Trotz der großen Varianz in der Proteinsequenz ist die Genstruktur identisch (Chmurzynska 2006).

Die Leber-Isoform des FABP (L-FABP) wird stark in den Hepatozyten exprimiert, wo es fünf Prozent der gesamten Zytosol-Proteine ausmacht (Negishi et al. 2007).

Zwei unterschiedliche Isoformen der FABPs können im Nierengewebe auffindig gemacht werden. Diese sind, anders als ihre Namen es erahnen lassen, die Herzisoform (H-FABP), im distalen Tubulus, und die Leber-Isoform (L-FABP) in den proximalen Tubuluszellen (Negishi et al. 2007). Schon eine Studie aus dem Jahre 1991 konnte dies zeigen (Maatman et al. 1991).

#### 5.3.1 Funktion und Bedeutung der FABPs

FABPs dienen unter anderem als intrazelluläre Empfänger für Fettsäuren. Zudem sind Mitglieder der FABP-Familie in der Modulation vom Zellwachstum und -proliferation involviert (Chmurzynska 2006). Die zelluläre Exkretion der FABPs ist primär auf der transkriptionellen Ebene reguliert und ist reaktionsfähig auf Änderungen im Fettstoffwechsel, welche verursacht werden durch (patho-) physiologische und pharmakologische Stimuli wie

eine Ischämie, Ausdauertraining, Diabetes und Medikamente (Glatz und van der Vusse 1996, Storch und Thumser 2000). Die Existenz von verschiedenen FABPs ließ darüber hinaus schon sehr früh auf eine typspezifische Funktion schließen (Maatman et al. 1992). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, sich die Funktion und Bedeutung der in der Niere vorkommenden Isoformen der fatty acid binding Proteine im Einzelnen anzuschauen.

### **5.3.1.1 *Liver-fatty acid binding protein (L-FABP)***

L-FABPs spielen eine Schlüsselrolle im Transport von Fettsäuren und sind ebenfalls in der Regulation der Genexpression und Zelldifferenzierung involviert (Bazzi et al. 2001, Zimmerman und Veerkamp 2002, Haunerland und Spener 2004, Huang et al. 2004, Antonenkov et al. 2006). Freie Fettsäuren, geladen von der Plasmamembran der proximalen Tubuli, werden an zytoplasmatische FABPs gebunden und zu Mitochondrien oder Peroxisomen transportiert (Bazzi et al. 2002), wo sie mittels Oxidation metabolisiert werden (Bazzi et al. 2001). Die verschiedenartigen freien Fettsäuren erfüllen verschiedene Aufgaben im Organismus. Sie sind wichtige Energiequellen, welche in Triglyceriden gespeichert werden und im Muskel und in der Leber produziert werden. Sie werden auch für das Formen komplexer Lipide, wie Phospholipide und Cholesterin, benutzt. Schließlich sind Reste der freien Fettsäuren Hormone und Signalkörper, welche spezifische Proteine modifizieren (Chmurzynska 2006). Kamijo et al. stellten die Hypothese auf, dass verschiedenartiger Stress auf die proximalen Tubuluszellen zu einer Überladung von Fettsäuren im Zytoplasma führen kann und dadurch die Zellen durch Freisetzen von Entzündungsfaktoren schädigt. Zu diesen Stresssituationen zählen neben dem Auftreten einer massiven Proteinurie sowohl der ischämische als auch toxische Insult (Kamijo et al. 2004a).

Das L-FABP besitzt eine hohe Affinität und Kapazität, langkettige Fettsäureoxidationsprodukte zu binden, und mag deswegen möglicherweise ein effektives endogenes Antioxidant sein (Portilla et al. 2008).

Die Leber-Isoform des FABPs bindet hydrophobe Moleküle wie Lysophospholipide, Eikosanoide, Gallensäure, Bilirubin, Häm und hypolipide Medikamente (Faber et al. 2006, Negishi et al. 2007) und schützt vermutlich zelluläre Strukturen vor Schaden durch einen Überschuss dieser Moleküle (Negishi et al. 2007).

Wie lässt sich nun ein Anstieg des L-FABP im Urin, wie er in dieser Arbeit gezeigt wurde, erklären und welche Bedeutung hat dieses Protein für den Organismus und speziell für die Nierendiagnostik?



Klinische Studien haben die Leber-Isoform des FABP als einen aussichtsreichen Biomarker sowohl für die chronische Nierenerkrankung (Kamijo et al. 2004a, Kamijo et al. 2006, Nakamura et al. 2007) als auch für das akute Nierenversagen dargestellt (Nakamura et al. 2006, Yamamoto et al. 2007, Portilla et al. 2008). Zudem berichten Nakamura et. al, dass der L-FABP-Spiegel im Urin signifikant bei Patienten mit septischem Schock erhöht ist und schlossen daraus, dass dies eine Reflektion auf die dazugehörige tubuläre Nierenschädigung sei (Nakamura et al. 2009). Diesbezüglich wurde eine Kohortenstudie mit 40 septischen Patienten veröffentlicht, von denen 28 Patienten überlebten und zwölf verstarben. Bei den Überlebenden wurde der L-FABP-Spiegel im Urin durch die Therapie reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht überlebenden Patienten einen höheren L-FABP-Spiegel im Urin mit einem kleineren Abfall nach der Therapie verglichen mit den überlebenden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass der L-FABP-Spiegel im Urin möglicherweise fähig ist, die Schwere einer Sepsis wiederzuspiegeln und gleichzeitig die Effektivität der Therapie darzustellen (Nakamura et al. 2009).

Neuere Studien haben das Urin-L-FABP als einen nützlichen Biomarker im klinischen Model eines ischämischen ANVs etabliert. Yamamoto et al. berichteten, dass der L-FABP-Spiegel im Urin gut mit der Ischämiezeit von transplantierten Nieren korrelierte (Yamamoto et al. 2007). Diesbezüglich wurde in einer in Japan durchgeführten Studie gezeigt, dass der urinale L-FABP-Level gut mit dem Grad der renalen Ischämie korreliert (Yamamoto et al. 2007).

Ferner erforschten Portilla et al. L-FABP im Urin als einen Biomarker eines ANVs bei pädiatrischen Kindern nach kardialen Operationen und fanden heraus, dass der L-FABP-Spiegel vier Stunden nach der Operation mit einer ROC-AUC von 0,81 (Sensitivität 0,714; Spezifität 0,684) voraussagend für die Patienten war, die anschließend ein ANV entwickelten (Portilla et al. 2008). Zudem legten Nakamura et al. dar, dass der Basiswert des L-FABPs im Urin signifikant am höchsten bei den Patienten war, die nach einer Koronarangiografie eine Kontrastmittelnephropathie entwickelten (Nakamura et al. 2006). Es gibt Hinweise, dass das Urin-L-FABP anderen neueren Biomarkern zum Teil überlegen ist. So wird in einer Arbeit der Forschungsgruppe um Ferguson et al. die prognostische Fähigkeit des Urin-L-FABPs ein ANV bei Patienten vorherzusagen bestimmt. Hierfür wurde die L-FABP Ausscheidung im Urin von 92 Patienten mit einem ANV mit 62 stationären oder ambulanten Patienten ohne klinische Anzeichen für ein Nierenversagen verglichen. Die diagnostische Fähigkeit, ein akutes Nierenversagen bei den stationären Patienten vorherzusagen, war beim L-FABP im Urin (ROC-AUC = 0,93) ebenso gut wie bei den bereits im oberen Abschnitt dargestellten neuen Biomarkern NGAL (0,92), KIM-1 (0,89) und war statistisch besser als beim IL-18

(0,83). Wie man vielleicht erwartet hätte, war die diagnostische Fähigkeit des Urin-L-FABPs optimal beim Vergleich der Patienten mit ANV mit gesunden Freiwilligen (ROC-AUC=1). Ebenfalls blieb die diagnostische Effizienz beim Vergleich der ANV-Patienten mit den stationären Patienten hoch. Ferner wurde in dieser Studie eine beträchtliche Überlappung der L-FABP-Urinwerte zwischen ANV-Patienten und Patienten von der Intensivstation beobachtet. Für dieses Phänomen werden zwei Begründungen in dieser Arbeit gegeben. Einerseits ist es möglich, dass der Anstieg des Urin-L-FABP-Spiegels bei akut Kranken auf der Intensivstation ohne Diagnose eines akuten Nierenversagens durch andere systemische Prozesse indiziert wird und deshalb eine geringere Spezifität für das ANV vorweist. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass ein ansteigender U-L-FABP-Spiegel in diesem Versuchsaufbau bedingt ist durch eine schleichende renale Schädigung, welche nicht in einen Anstieg des Serum-Kreatinin mündet und deswegen eine höhere Sensitivität für das ANV widerspiegelt. Die Schwierigkeit zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu differenzieren, wird so lange bestehen bleiben, bis neue Biomarker für den suboptimalen Referenzstandard des Serum-Kreatinins gefunden werden (Ferguson et al. 2010).

Es gibt viele Forschungsgruppen, die mit verschiedenen Tiermodellen arbeiten, um die Rolle des L-FABP besser verstehen zu können. So zeigte eine Arbeit von Maatman et al. schon im Jahre 1992 an Hand von Nagetiermodellen, dass es kein Unterschied zwischen der männlichen und weiblichen Niere bezüglich der Menge des L- und H-FABPs im distalen und proximalen Nierengewebe gibt (Maatman et al. 1992). Ferner versuchte die Arbeitsgruppe um Negishi et al. mit Hilfe von Mäusen die Bedeutung von L-FABP beim Cisplatin-induzierten ANV auszumachen (Negishi et al. 2007). Die Niere von Nagetieren scheint eine nicht signifikant große Menge von L-FABP zu produzieren (Simon et al. 1993). Neuere Studien vermuten, dass sich unter normalen Umständen L-FABP nicht nur im lysosomalen Kompartiment des proximalen Tubulus befindet, sondern auch aus dem glomerulärem Filtrat via Megalin, einem multiligand Rezeptor des proximalen Tubulus, resorbiert wird (Oyama et al. 2005). Bezüglich der Forschungsarbeit mit Nagetieren ist zu bedenken, dass der Wert von L-FABP in der menschlichen Niere deutlich höher ist als im Nagetiernierengewebe. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass anders als bei z.B. Ratten, wo L-FABP nicht nur im proximalen, sondern auch im distalen Tubulus zu finden ist, beim Menschen dieses Protein in der Niere nur im proximalen Tubulus aufzufinden ist (Maatman et al. 1991, Maatman et al. 1992). Aus diesem Grund benutzen neuere Studien genetisch veränderte Mäuse, welche höhere Proteinmengen menschlicher L-FABP (h-L-FABP) im Vergleich zu nicht genetisch veränderten Mäusen exprimieren. In diesem Zusammenhang demonstrierten Noiri et.al, dass

die Mäuse, die einen höheren h-L-FABP-Wert im Urin aufzeigten, eine ischämische Reperfusionsschädigung durchlitten (Kamijo et al. 2004b, Negishi et al. 2007). Eine andere Arbeit von Kamijo et al, welche h-L-FABP transgene Mäuse benutzte und an Hand derer man ein künstlich erzeugtes ANV durch eine unilaterale Ureterobstruktion erzeugte, zeigte, dass h-L-FABP, welches in den proximalen Tubuli exprimiert wurde, in diesem Modell hochreguliert wurde und dass diese gesteigerte Exkretion wahrscheinlich die Entwicklung eines tubulointestinalen Schadens suppressierte. Auf Grund dieser Beobachtung folgerten die Forscher, dass das renale L-FABP möglicherweise ein effektiver endogener Antioxidant sei (Kamijo-Ikemori et al. 2006).

L-FABP ist ebenfalls in der Zirkulation gesunder Individuen präsent (Pelsers et al. 2002) und dient als ein Transportprotein für diverse Liganden. Patienten mit einem Leberschaden haben ebenso einen erhöhten Serum L-FABP-Spiegel (Pelsers et al. 2002) wie auch einen erhöhten Serumspiegel von Bilirubin, Gallensäure und anderen Metaboliten, welche im einzelnen selbst nephrotoxisch sein können (Oyama et al. 2005). So wird die Vermutung aufgestellt, dass Patienten mit Leberschaden eine renale tubuläre Schädigung erleiden, welche vermutlich aus der direkten Wirkung der nephrotoxischen Substanzen wie eben Bilirubin und Gallensäure resultiert (Bairaktari et al. 2001). Dieses ließ die Forschungsgruppe um Oyama et al. vermuten, dass L-FABP möglicherweise eine pathologische Rolle im Transport von erhöhten Mengen von Liganden zu anderen Geweben innehat, indem es wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben, die toxischen Stoffe in die proximale Tubuluszelle mittels Rezeptoren bringt, welche dort durch eine Anhäufung schädlich auf die Nierenzellen wirken. Anders als bei Kamijo et al., bei denen das L-FABP als ein endogenes Antioxidant gesehen und eher die protektive Rolle in den Mittelpunkt gestellt wurde, können auf diese Art und Weise durch L-FABP transportierte freie Fettsäuren angehäuft in proximalen Tubuluszellen eine tubuläre Schädigung bewirken (Oyama et al. 2005).

Nakamura et al. zeigten mit ihrer Arbeit, dass das urinale L-FABP ein sehr wichtiger unabhängiger Biomarker für die Entwicklung eines kontrastmittelinduzierten Nierenversagens ist. U-L-FABP-Spiegel, welche vor der Angiographie bestimmt wurden, waren signifikant bei den Patienten höher, bei denen eine kontrastmittelinduzierte Nephropathie auftrat, als bei denen, welche von einer Erkrankung verschont blieben (Nakamura et al. 2006).

Nun stellt sich die Frage, ob der L-FABP-Spiegel im Urin ein allein für die Niere sensitiver und spezifischer Wert ist oder ob dieser durch z.B. Leberschäden und dadurch bedingt erhöhte Serum-L-FABP-Werte, welche dann durch die Nieren ausgeschieden werden, verfälscht oder gar hauptsächlich beeinflusst wird. Diesbezüglich berichtete die

Forschungsgruppe um Kamijo et al. in einer ihrer Arbeiten, dass sich die L-FABP-Ausscheidung im Urin signifikant höher bei Patienten mit Nierenerkrankung zeigte als bei Patienten mit Lebererkrankungen und bei gesunden Freiwilligen. Des Weiteren ließ sich erkennen, dass die U-L-FABP-Ausscheidung bei Patienten mit Lebererkrankungen nicht signifikant größer war als bei den gesunden Freiwilligen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die These erstellt, dass der Serum-L-FABP-Spiegel keinen Einfluss auf den L-FABP-Spiegel im Urin hat (Kamijo et al. 2006). Dieses erscheint besonders interessant, wenn man berücksichtigt, dass Patienten mit Leberschaden einen erhöhten Plasma-Spiegel des L-FABPs vorweisen (Oyama et al. 2005). Ebenso wurde bei Sepsis gesehen, dass in diesem Fall der Serum-L-FABP-Spiegel keinen Einfluss auf die Ausscheidungsmenge des L-FABPs im Urin hat (Nakamura et al. 2009). Eine Studie, die ebenfalls Unterschiede zwischen Serum-L-FABP und Urin-L-FABP aufzeigte, ist die der Arbeitsgruppe um Portilla et al. Kernaussage ihrer Arbeit ist, dass bei den Kindern, die nach einer kardialen Operation ein ANV entwickelten, der L-FABP-Spiegel im Urin nach vier Stunden im Gegensatz zu denen, die kein Nierenversagen erlitten hatten, signifikant angestiegen war, wohingegen das Serum-Kreatinin bei den Patienten, die ein ANV entwickelten, erst nach 24-72 h nach einer Operation anstieg. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Patienten, die ein ANV nach einer Herzchirurgie entwickelten, einen signifikanten Anstieg des Serum-L-FABP-Wertes 12 h postoperativ zeigten im Vergleich zu Serum-L-FABP-Werten gemessen bei Patienten, die kein akutes Nierenversagen entwickelten. Im Gegensatz dazu, stieg der L-FABP-Wert im Urin gemessen bei den gleichen Patienten, die ein ANV entwickelten, wie bereits beschrieben, innerhalb der ersten 4 h postoperativ, während der Urin-Spiegel bei den Patienten, die kein ANV entwickelten, nicht anstieg. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Anstieg des U-L-FABP-Spiegels 4 h nach einer Herzoperation bei ANV-Patienten nicht nur eine erhöhte Filtration von hohen Serum-Spiegeln reflektiert, sondern vielmehr einen Anstieg der Ausscheidung von L-FABP aus dem proximalen Tubulus anzeigt (Portilla et al. 2008).

### ***5.3.1.2 Heart-fatty acid binding protein (H-FABP)***

H-FABP ist ein zytoplasmatisches Protein, welches hauptsächlich in Kardiomyozyten vorkommt und hier involviert ist in Aufnahme, Transport und Metabolismus von Fettsäuren (Schaap et al. 1998). Wegen dieser Merkmale wurde schon früh vermutet, dass dieses Protein leicht aus den geschädigten Myokardzellen austritt und schnell im zirkulierenden Blut und Urin erscheint (Sohmiya et al. 1993). Durch neuere Studien wurde diese Vermutung weiter erhärtet (Pelsers et al. 2005). Dieses Protein ist besonders wichtig für die myokardiale

Homöostase. Dies wird dadurch unterstrichen, dass 50-80 % der Herzenergie durch Lipidoxidation bereitgestellt wird und H-FABP den intrazellulären Transport der unlöslichen Fettsäuren sichert (Alhadi und Fox 2004).

H-FABP wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen als ein kardiospezifischer Marker für die frühe Beurteilung eines myokardialen Schadens bei Patienten nach einer Operation am Herzen genannt (Hayashida et al. 2000).

Nun wird die Niere ebenfalls als ein Auffindungsort dieses Proteins beschrieben. Hier ist es ebenfalls ein Protein im Zytosol, welches in distalen renalen Tubuluszellen zu finden ist und genau wie in den Myokardzellen beim Transport von freien Fettsäuren aus dem Zytosol zu den Mitochondrien involviert und auch im Urin zu finden ist (Veerkamp und van Moerkerk 1993, Moers et al. 2010). Darüber hinaus wurde in einer Studie bereits beschrieben, dass eine steigende H-FABP-Ausscheidung im Urin mit einer Nierengewebsschädigung assoziiert ist (Pelsers et al. 2005).

## **5.4 Prognosemöglichkeit für den Beginn einer Nierenersatztherapie**

Kernaussage dieser Arbeit ist, dass sowohl durch die fettsäurebindenden Proteine L- und H-FABP als auch durch die in Abschnitt 4.1.3 beschriebene Formel die NET rechtzeitig begonnen werden kann. Wie in Abschnitt 4.2.3 bereits beschrieben, ist für das fettsäurebindende Protein L-FABP ein Regulationsunterschied von der ND- auf die D-Gruppe von 6,490 ( $p = 0,001$ ) zu erkennen und für das andere fettsäurebindende Protein H-FABP eine signifikante Heraufregulation von der ND-Gruppe auf die D-Gruppe von 5,076 ( $p = 0,05$ ) zu finden.

### **5.4.1 Prognosefähigkeit des L-FABPs**

Es gibt kontroverse Aussagen bezüglich des Beginns einer Nierenersatztherapie auf Grund des L-FABPs im Urin. So wird in einer Arbeit von Nakamura et al. von einer fehlenden Korrelation des L-FABP-Spiegel im Urin mit der Notwendigkeit einer NET berichtet (Nakamura et al. 2009). Ein Grund für dieses Ergebnis kann einerseits an der Exklusivität des Patientenguts und andererseits an der geringen Fallzahl dieser Studie liegen, was deutlich bei der Betrachtung der Zusammensetzung des Patientenkollektivs wird. Es wurden Patienten mit septischem Schock mit Patienten mit einer schweren Sepsis ohne Schock, wie es nach den Regelungen der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee beschrieben ist, verglichen. Des Weiteren wurden Vergleiche zwischen 20 Patienten mit einem akuten Nierenversagen (mit einem

durchschnittlichen Kreatinin-Wert von 2,8 mg/dl bedingt durch Hypovolämie (n = 8), ein Medikamenten-induziertes ANV (n = 4), Rhabdomyolyse (n = 2), Cholesterol-Embolie (n = 2) und bedingt durch ein ANV unbekannter Ursache (n = 4)) und 30 altersangeglichenen gesunden Freiwilligen gezogen. Patienten konnten in die Studie aufgenommen werden, wenn sie definierbare Quellen einer Infektion und/oder positive Blutkulturen vorzeigen konnten. Patienten mit kardiogenem oder hämorrhagischem Schock wurden aus der Studie ausgeschlossen (Nakamura et al. 2009).

Es gibt allerdings auch Studien, die Hinweise darauf geben, dass insbesondere das L-FABP zur Entscheidungsfindung, ob eine Dialyse durchgeführt werden soll oder nicht, genutzt werden kann.

Beispielsweise werden in einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Ferguson et al. 92 Patienten mit ANV verschiedenster Genese, bestimmt an Hand eines Serum-Kreatinin-Anstiegs und gleichzeitig klinischer Manifestation, mit 68 Patienten ohne Anzeichen eines akuten Nierenversagens verglichen. Diese setzen sich zusammen aus 29 gesunden Freiwilligen, 13 kritisch Kranken von der Intensivstation ohne Diagnose eines akuten Nierenversagens und 26 Patienten, welche für eine elektive Herzkatheteruntersuchung vorgesehen waren, dabei allerdings keine klinischen Anzeichen eines ANVs zeigten. In einer altersangepassten Analyse, welche logtransformierte, normalisierte Werte benutzte, stellte sich das L-FABP im Urin als Vorhersager für das Benötigen einer NET ( $p = 0,02$ ) heraus. Allerdings konnten hier mit Hilfe des urinalen L-FABPs keine Aussagen über die stationäre Sterblichkeit ( $p = 0,26$ ) getroffen werden (Ferguson et al. 2010). Ein weiterer erwähnenswerter Punkt dieser Studie ist, dass hier an Hand der Krankenblätter die verschiedenen Ursachen für das akute Nierenversagen jedes einzelnen Patienten ermittelt wurden. Diese waren im Einzelnen: Eine akute tubuläre Nekrose bedingt durch Ischämie, postkardielle Chirurgie oder Pigmentnephropathie (n = 28), Sepsis (n = 30), eine nephrotoxische Exposition (n = 6), Kontrastmittelnephropathie (n = 5) sowie andere Ursachen (n = 23): Obstruktion, akute intestinale Nephritis, akute Glomerulonephritis, multiple Myelome, prerenal, vaso-okklusive Erkrankung, Tumor-lyse-Syndrom. Interessanterweise wurde kein statistischer Unterschied des urinären L-FABP-Spiegels zwischen den oben beschriebenen Krankheitskategorien festgestellt (Ferguson et al. 2010).

### 5.4.2 Prognosefähigkeit des H-FABPs

Das H-FABP wurde bereits in Veröffentlichungen zusammen mit dem L-FABP als ein möglicher sensitiver Biomarker für das frühe Entdecken eines Nierenschadens und für die Überwachung der Behandlung der Patienten vorgestellt (Pellers 2008).

Für das H-FABP gibt es bezüglich der Prognosefähigkeit für das Benötigen einer NET allerdings noch kaum aussagefähige Studien. Dies lässt viel Spielraum für Spekulationen. So könnte das H-FABP ein neuer Biomarker für die renale Schädigung sein, der Aussagen zum Schädigungsgrad macht, z.B. als Hinweis für eine Schädigung der distalen Tubuluszellen. Studien müssen folgen, um die Bedeutung des H-FABPs als Biomarker für die renale Schädigung und das Benötigen einer NET zu klären. Ebenso muss erforscht werden, wie sensitiv und spezifisch dieses Protein allein für die Nierenfunktion sein kann, da, wie bereits erwähnt, bei Schädigung des Myokards, bereits frühzeitig H-FABP im Urin zu finden ist.

Es ist unwahrscheinlich ein einzelnes Protein zu finden, das als universeller Marker für die Diagnose eines Nierenschadens benutzt werden kann, und das zusätzlich im Stande ist, eine Vorhersage über den Schweregrad der Schädigung treffen zu können (Arthur et al. 2008) und gleichzeitig die Möglichkeit gibt, eine Entscheidungshilfe zu bieten, ob ein Patient dialysiert werden soll oder nicht. Eine Kombination von Biomarkern und klinischen Informationen wäre eventuell fähig, eine bessere Aussage darüber zu treffen (Arthur et al. 2008).

### 5.4.3 Prognosefähigkeit der Formel

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich auch damit, mittels bereits in der Klinik im Routinelabor etablierter Parameter eine Vorhersage zur Dialysepflichtigkeit eines Patienten zu treffen. So lag, wie in Abschnitt 4.1.3 zu sehen, der mit Hilfe einer ROC-Analyse berechnete optimale Grenzwert für die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie, welcher durch die Formel ohne die tägliche Diurese berechnet wurde, bei 0,48. Dies ergab eine Sensitivität von 77 %, eine Spezifität von 82 % und eine Treffgenauigkeit (AUC) von 88 %.

Bereits andere Studien versuchten durch Kombinationen von Biomarkern verschiedene Krankheitsbilder schneller bzw. besser zu erkennen. Beispielsweise wird in einer Studie von Shapiro et al. von dem Versuch berichtet, durch Kombination von verschiedenen Biomarkern effektiver eine schwere Sepsis vorherzusagen. Hierfür wurden neun Biomarker aus dem Blut geprüft. Zur Vorhersage dieses schweren Krankheitsbildes wurde mittels einer multivariablen logistischen Regression eine optimale Kombination aus diesen Parametern gesucht. Letztlich

wurde hier eine Kombination aus NGAL, Cystatin C und Interleukin-1 gefunden, welche eine AUC von 0,80 für eine schwere Sepsis, 0,77 für einen septischen Schock und 0,79 für einen tödlichen Ausgang hat (Shapiro et al. 2009).

Bezüglich der besseren bzw. schnelleren Identifizierung eines ANVs gibt es ebenfalls einige Studien. So wurde bei Hun et al. der Urin von 40 pädiatrischen Patienten ausgewertet. Ein akutes Nierenversagen wurde an Hand eines Kreatininanstiegs um 50 % vom Basis-Grundwert ausgehend bei 8 von 20 Patienten zwischen 24 und 48 h nach einer kardiopulmonalen Bypassoperation festgestellt. Eine Kombination der Biomarker NAG und KIM-1 mittels linearer Kombination konnte mit einer AUC von 0,79 nach 24 h und von 0,81 nach 48 h das ANV vorhersagen (Han et al. 2008).

In einer anderen Studie derselben Arbeitsgruppe wurden die Werte für KIM-1, NAG und NGAL an fünf verschiedenen Zeitpunkten im Urin innerhalb der ersten 24 h nach einer Herzoperation bestimmt und mit Hilfe des Urin-Kreatinin-Wertes direkt nach dem Eingriff normalisiert. 36 Patienten entwickelten ein akutes Nierenversagen, definiert als ein Anstieg des Serum-Kreatinins um mehr als 0,3 mg/dl vom Basiswert oder einem absoluten Anstieg des Serum-Kreatinins um das zwei- bis dreifache vom Grundlinienwert innerhalb von 72 h nach dem operativen Eingriff. In dieser Studie wurde eine multiple logistische Regression benutzt, um KIM-1, NAG und NGAL miteinander zu kombinieren. Die AUC-Werte für die kombinierten Biomarker lagen bei 0,75 direkt nach der Operation und bei 0,78 nach drei Stunden nach der Operation (Han et al. 2009).

Die richtige Kombination der richtigen Biomarker für den klinischen Alltag bleibt eine Herausforderung (Han et al. 2009). Weitere Studien müssen diesbezüglich folgen.

## 5.5 Methoden

Der Großteil dieser Arbeit basiert auf den Ergebnissen, welche proteinbiochemisch mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese gewonnen wurden. Serum und Urin bieten sich auf Grund ihrer relativ leichten Gewinnung als Probenmaterial an. Doch sind Serum und Urin nicht miteinander vergleichbar (Lee et al. 2008). Serum mag zwar als Informationsträger bei Anurie zur Verfügung stehen, spiegelt aber eher eine systemische Antwort eines Krankheitsprozesses wieder als eine spezifische Organbeteiligung. Außerdem macht eine große Anzahl an diversen Proteinen im Blut, wie z.B. Albumin und die Immunglobuline, eine proteomische Untersuchung schwierig (Devarajan 2007). Urin im Gegensatz dazu hat einige wichtige Vorteile. So ist die Gewinnung non-invasiv und es ist leicht eine große Menge zu erhalten. Des Weiteren sind Peptide und Proteine weit weniger komplex als im Serum (Devarajan



2007) und wahrscheinlich auf Grund der geringeren Proteasekonzentration im Urin stabiler als im Serum. Diesbezüglich wurde berichtet, dass der Proteingehalt im Urin sowohl bei Raumtemperatur bis zu 24 h als auch bei multiplen Einfrier-Auftau-Zyklen bei Lagerung stabil bleibt (Lee et al. 2008). Außerdem scheint das Alter der Patienten keinen Einfluss auf die Proteinausscheidung zu haben (Lafitte et al. 2002). Ebenso wurde gezeigt, dass Proben aus morgendlich abgegebenem Mittelstrahlurin das gleiche 2D-Muster darbieten wie Proben aus gesammeltem 24 h-Urin (Lafitte et al. 2002). Bezüglich des L-FABPs wurde beschrieben, dass der L-FABP-Spiegel im 24 Stunden Sammelurin signifikant mit dem des Spontanurins korreliert (Nakamura et al. 2006). Trotz aller Vorteile gibt es doch auch einige Aspekte, die Urin für die Proteomics nachteilig erscheinen lassen. Es gibt viele Faktoren, die Einfluss auf die Proteinausscheidung im Urin haben. So können unter anderem Essen, Medikamente, tägliche Aktivitäten, Stress, der menstruale Zyklus, erhöhte Temperaturen, selbst eine zu hohe Luftfeuchtigkeit oder andere Umweltfaktoren die Proteinausscheidung beeinflussen. Auch wird in diesem Zusammenhang ein Unterschied zwischen Urin von Männern und Frauen beschrieben. Der männliche Urin hat eine größere Menge an Proteinen, bietet aber dafür eine kleinere Anzahl an Proteinspots verglichen mit weiblichem Urin (Thongboonkerd et al. 2006). Ebenfalls wurde berichtet, dass es größere Unterschiede in den Proteinmengen von Urinproben gab, die an verschiedenen Tagen gesammelt wurden (Prescott et al. 2007). Es ist des Weiteren zu beachten, dass auch erhebliche intra-individuelle Variabilitäten existieren. Der Urin desselben Individuums kann sehr unterschiedlich sein, abhängig z.B. von der Tageszeit, Flüssigkeits- bzw. Nahrungsaufnahme, Medikamenteneinnahme etc. (Thongboonkerd et al. 2006).

Urin kann des Weiteren einige Schwierigkeiten in der proteomisch analytischen Weiterverarbeitung machen. Normaler Urin besitzt eine sehr verdünnte Proteinkonzentration mit einem hohen Salzgehalt, welches mit der proteomischen Analyse interferieren kann, speziell während der isoelektrischen Fokussierung (Thongboonkerd et al. 2006). Diesbezüglich zeigt der Standard- oder modifizierte Bradfordtest Einschränkungen auf Grund der optischen Komplexität des Urins, des bereits erwähnten hohen Salzgehalts, anderen interferierenden Komponenten und der geringen Proteinkonzentration (Lee et al. 2008). Aus diesem Grund ist es wichtig, Proteine im Urin zu isolieren bzw. zu konzentrieren und störend eingreifendes Salz zu eliminieren (Thongboonkerd et al. 2006).

Hier spielt die Proteinextraktion eine mitentscheidende Rolle. Welche Proteinextraktion die besten Ergebnisse zeigt, ist nicht eindeutig geklärt. In diesem Zusammenhang benutzten Lee et al. eine Standard-Bradford-Lösung, um gängige Methoden der Proteinextraktionen zu

untersuchen. Diese waren unter anderem eine Ethanol-Fällung, Vakuum-Zentrifugation und VivaSpin-Mikrokonzentration. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden (Lee et al. 2008). Allerdings gab die Arbeitsgruppe um Magistroni et al. in einer ihrer Veröffentlichungen an, mit der Acetonfällung im Vergleich zu anderen Methoden der Proteinextraktion die besten Ergebnisse erzielt zu haben (Magistroni et al. 2009). In der Arbeit der Gruppe um Thongboonkerd et al. wiederum wurden die besten Resultate mit einer 90 %igen Ethanolfällung erreicht (Thongboonkerd et al. 2006). Diese Vielfalt an Ergebnissen zeigt, dass ein optimales Protokoll zur Proteingewinnung aus dem Urin nicht existiert. Vielmehr muss man ganz individuell von Patient zu Patient, von Studie zu Studie eine Entscheidung treffen, welches Fällungsprotokoll am besten geeignet ist. In unserer Studie hat die Chloroform/Methanol-Fällung die besten Ergebnisse geliefert.

Da die Proteinausscheidung im Urin, wie im vorangegangenen Teil beschrieben, von sehr vielen Dingen abhängig ist, ist es schwierig, einzelne Störfaktoren zu benennen oder gar zu beseitigen. Aus diesem Grund war es auch in dieser Arbeit nicht möglich herauszufinden, was die Ursache für die Kontamination in der 2D-Elektrophorese war. Es könnte sich um Medikamente handeln, die nach Einnahme harnpflichtig ausgeschieden werden und die reproduzierbaren Kontaminationen hervorrufen. Weitere Studien diesbezüglich sind nötig, um eine befriedigende Antwort zu liefern.

## 5.6 Fazit

Im Vergleich zu den genannten Studien bietet diese Dissertationsarbeit einige Besonderheiten. So wurden bei allen erwähnten Forschungsarbeiten ANV-Patienten mit gesunden Patienten verglichen bzw. mit Patienten, die keine Anzeichen eines ANVs aufzeigten. Auf diese Art und Weise ließen sich relativ leicht signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen finden.

Um die fragliche Dialysepflichtigkeit und den optimalen Zeitpunkt einer NET der Patienten zu klären, wurden in dieser Arbeit zwei Gruppen miteinander verglichen, in denen alle Patienten ein akutes Nierenversagen entwickelt haben. In die ND-Gruppe wurden alle Patienten mit einem ANV eingeteilt, deren Nierenfunktion sich im Verlauf einer alleinigen konservativen Therapie regenerierte, d.h. die während des gesamten Krankenhausaufenthalts bis zur Entlassung keine Nierenersatztherapie benötigten. In die Dialyse-Gruppen wurden alle Patienten eingeteilt, deren akutes Nierenversagen dialysepflichtig wurde, wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Arten der Nierenersatztherapie gemacht wurde. Als Ergebnis zeigten sich L-FABP, H-FABP und die in Abschnitt 4.1.3 genannte Formel als fähig, eine Dialyseindikation für die Patienten zu stellen.

Die aktuelle Studie schloss 120 Patienten mit ANV ein, welche nach dem oben beschriebenen Schema in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Trotzdem müssen weitere prospektive Studien mit größeren Fallzahlen folgen, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Von den 120 an ANV Erkrankten entfielen 68 Patienten auf die ND-Gruppe, 52 Patienten auf die D-Gruppe. Das prärenale akute Nierenversagen war in beiden Gruppen mit über 90 % die mit Abstand häufigste Genese. In der ND-Gruppe war die häufigste Ursache für das prärenale Versagen mit fast 74 % eine kardiogene Genese, in der D-Gruppe mit 50 % die septische Genese. Interessant erscheint diese Tatsache, wenn man bedenkt, dass die Sepsis einer der führenden Faktoren des ANVs bei kritisch kranken Patienten ist und in der Regel auf eine schlechte Prognose hindeutet (Bagshaw et al. 2007). Bei der Rolle, die insbesondere L-FABP in der Diagnose der Sepsis, wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben, zu spielen scheint, vermag dieses Protein Patienten spezifischer zu detektieren, die sowohl unter einer Sepsis als auch gleichzeitig unter einem akuten Nierenversagen leiden und einer NET bedürfen. Diesbezüglich müssten noch weitere Studien folgen.

Das Finden und Entwickeln von Biomarkern und diagnostischen Untersuchungs-Kits enthält vier Schritte: Die Entdeckungsphase, die klinische Untersuchungs- und Validationsphase, die Phase über die Entscheidung der Nützlichkeit eines Biomarkers und schließlich die kommerzielle Entwicklungsphase. L-FABP als Marker für das akute Nierenversagen hat

bereits Schritt vier erreicht (Doi et al. 2010). H-FABP müsste als Marker für die Schädigung der renalen Funktion noch weitere Instanzen durchlaufen.

Nichtsdestotrotz bestehen grundsätzliche Probleme, wenn es um die Erforschung neuer Biomarker für das Einleiten einer NET oder das akute Nierenversagen geht. So gibt es sehr viele Ursachen und Erscheinungsformen des ANVs, so dass es schwierig ist, diese miteinander zu vergleichen. Insbesondere wird dies bei Patienten z.B. auf der Intensivstation erschwert, die an mehreren Erkrankungen leiden. Patienten dieser Studie waren zum größten Teil multimorbide. Biomarker zu finden, die nur auf ein Organ zurückzuführen sind, ist sehr schwierig. Zukünftige Studien sollten auf eine gewisse Homogenität des Patientenpools achten.

Ferner gibt es keine Standarddefinition für das akute Nierenversagen, welches nicht auf einer Änderung des Serum-Kreatinin-Werts basiert. Das eventuell schlechte Abschneiden von Biomarkern beim frühen Erkennen eines ANVs mag auch ein Problem der Definition sein (Han et al. 2009). So kann ein Patient ein ANV erlitten haben, welches zwar neuere Biomarker im Urin oder Serum ansteigen, Serum-Kreatinin allerdings noch nicht ansteigen lässt.

Ebenso ist es schwierig alle Patienten mit einem ANV, welche eine NET benötigen, zu identifizieren. Dies liegt an der Vielfältigkeit der Bedingungen, den Unterschieden in den Definitionen und der unterschiedlichen Handhabung in den einzelnen Kliniken (Prescott et al. 2007). Dort, wo noch keine exakten Angaben bezüglich des richtigen Zeitpunkts einer NET möglich sind, mag es sein, dass Patienten, die eigentlich hätten dialysiert werden müssen, nicht dialysiert wurden und umgekehrt. Es besteht ein dringender Bedarf einer neuen Standarddefinition des akuten Nierenversagens, welche nicht auf einem Wechsel des Serum-Kreatinins basiert (Han et al. 2009).

## 6 Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen hat eine große Bedeutung in der modernen Medizin. Schon sehr viele Studien konnten zeigen, dass das ANV ein unabhängiger Risikofaktor für die Sterblichkeit und die Entwicklung eines ANVs bei intensivpflichtigen Patienten mit einem Anstieg der Mortalität assoziiert ist.

Trotz der Wichtigkeit des ANVs gab es eine lange Zeit keinen Konsens über die diagnostischen Kriterien oder klinische Definition, was zu beinahe 35 verschiedenen Definitionen in der medizinischen Literatur führte, was die Erforschung dieser Erkrankung erschwerte. Obwohl sich das Management zur Therapie des akuten Nierenversagens mit den Möglichkeiten der modernen Methoden der NET verändert hat, haben diese Veränderungen nicht dazu beigetragen, das Outcome der Patienten nachhaltig zu verändern. Dies mag daran liegen, dass trotz etablierter Indikationskriterien der optimale Zeitpunkt für den Beginn einer NET nach heutigem Stand der Wissenschaft nicht bekannt, und mit dem Serum-Kreatinin ein Marker vorhanden ist, welcher sich nicht für eine Früherkennung eignet.

Ziel dieser prospektiv klinisch-experimentellen Studie war es, neue Möglichkeiten aufzudecken, den Zeitpunkt einer NET bei akutem Nierenversagen weiter zu optimieren.

Diesbezüglich wurden Patienten mit einem ANV, je nachdem ob sie dialysepflichtig wurden oder nicht, in die Gruppen D (Dialyse) und ND (Nicht-Dialyse) eingeteilt, welche in Folge dieser Arbeit miteinander verglichen wurden.

Es wurden bei der Ausführung des Projektes zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Auf der einen Seite wurde versucht, durch bereits in der Klinik etablierte Messparameter von Patientenblut und -urin einen Algorithmus zu berechnen, der bei der Entscheidungsfindung, ob bei einem aufgetretenen akuten Nierenversagen dialysiert werden muss oder nicht, helfen sollte. Auf der anderen Seite wurde auf Basis der 2D-Gel-Elektrophorese und Massenspektrometrie nach Optimierung der Fällungsmethodik eine proteomische Urinanalytik betrieben, um einen Biomarker zu finden, welcher die Früherkennung eines dialysepflichtigen akuten Nierenversagens ermöglicht.

Als Ergebnis der Forschungsarbeit konnte nach Prozessoptimierung einerseits unter anderem ein Algorithmus gefunden werden, welcher mit einer AUC von 88 %, einer Sensitivität von 77 % und Spezifität von 82 % bei einem Grenzwert von 0,48 Patienten in die richtige Gruppe einteilte. Andererseits konnten Exkretionsunterschiede für zwei Arten des fettsäurebindenden Proteins (Fatty Acid Binding Protein) gefunden werden. Diese waren das liver-fatty acid binding protein (L-FABP; FABP1), welches einen Regulationsunterschied von der ND- auf

die D-Gruppe von 6,490 ( $p = 0,001$ ) zeigte, sowie das heart-fatty acid binding protein (H-FABP; FABP3), das eine signifikante Heraufregulation von der ND-Gruppe auf die D-Gruppe von 5,076 ( $p = 0,05$ ) erkennen ließ. In unabhängigen Experimenten wurde via Dot Blot der Exkretionsunterschied dieser beiden lipidbindenden Proteine bestätigt.

Bislang wurden neun verschiedene FABPs mit gewebsspezifischer Verteilung identifiziert, benannt nach dem Gewebe, in dem sie das erste Mal identifiziert worden sind. Bereits bekannt ist, dass L-FABPs eine Schlüsselrolle im Transport von Fettsäuren spielen und ebenfalls in die Regulation der Genexpression und Zelldifferenzierung involviert sind. H-FABP ist ein zytoplasmatisches Protein, welches hauptsächlich gehäuft in Kardiomyozyten vorkommt, und hier ebenfalls in Aufnahme, Transport und Metabolismus von Fettsäuren involviert ist.

Sowohl durch die fettsäurebindenden Proteine L- und H-FABP als auch durch den in dieser Arbeit beschriebenen Algorithmus kann eine Dialyseindikation für Patienten mit einem ANV gestellt werden. Weitere prospektive Studien müssen folgen, um diese Ergebnisse besser zu verifizieren.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ALBU_HUMAN	Serum Albumin
ANA	anti-nukleärer Antikörper
ANCA	anti-neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper
ANV	Akutes Nierenversagen
AUC	Area under the curve
B2MG_HUMAN	Beta-2-Mikroglobulin
BMI	Body mass index
BSA	Bovines Serum Albumin
CAPD	kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse
CAVH	kontinuierliche arterio-venöse Hämofiltration
CCPD	kontinuierliche zyklische Peritonealdialyse
CNI	chronische Niereninsuffizienz
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CST6	Cystatin M
CT	Computertomographie
CVVH	kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration
CVVHDF	kontinuierliche veno-venöse Hämodialyse und Hämofiltration
D	Dialyse
d	Tag
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung
DIGE	Differentielle In-Gel-Elektrophorese
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FABP 1	liver-fatty acid binding protein
FABP 3	heart-Fatty acid binding protein
FABP5_HUMAN	Fatty Acid-Binding protein, epidermal
FABPH_HUMAN	Fatty Acid-Binding protein, heart
FABPL_HUMAN	Fatty Acid-Binding protein, liver
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtration
H	Chemisches Zeichen für Wasserstoff
Hb	Hämoglobin
H-FABP	Heart-Fatty acid binding protein
Hk	Hämatokrit
Hkt	Hämatokrit
h-L-FABP	transgene Überexpression menschlicher L-FABPs
Hz	Hertz
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IL	Interleukin
IPD	intermittierende Peritonealdialyse
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
K	Kalium
kDa	kiloDalton
KHI	Kongestive Herzinsuffizienz
KHK	Koronare Herzerkrankung
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
L-FABP	liver-fatty acid binding protein
LOOCV	Leave-One-Out Kreuzvalidierung
m	Masse
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MALDI-TOF MS Analyse	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight MS Spectrometry
max	maximal
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
min	minimal
MOWSE	MOlecular Weight SEarch
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut off
Na	Natrium
ND	Nicht Dialyse
NET	Nierenersatztherapie
NGAL	Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
P	Plasma
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
pep	Zahl der Peptide, die zur Identifizierung analysiert wurden
pH	potentia Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	peptide mass fingerprint
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage Kidney
ROC	Receiver Operating Characteristic
S	Serum
SA	Standardabweichung
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SELDI	Surface enhances laser desorption/ionization
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	Time of Flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan



U-	Urin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 8 Literaturverzeichnis

Abernethy VE, Lieberthal W (2002): Acute renal failure in the critically ill patient. *Crit Care Clin* 18: 203-22

Ahlstrom A, Tallgren M, Peltonen S, Pettila V (2004): Evolution and predictive power of serum cystatin C in acute renal failure. *Clin Nephrol* 62: 344-50

Albanese J, Leone M, Garnier F, Bourgoin A, Antonini F, Martin C (2004): Renal effects of norepinephrine in septic and nonseptic patients. *Chest* 126: 534-9

Alhadi HA, Fox KA (2004): Do we need additional markers of myocyte necrosis: the potential value of heart fatty-acid-binding protein. *QJM* 97: 187-98

Allen JD, Parsons SM (1979): Nitrocellulose filter binding: quantitation of the histidyl-tRNA-ATP phosphoribosyltransferase complex. *Anal Biochem* 92: 22-30

Antonenkov VD, Sormunen RT, Ohlmeier S, Amery L, Fransen M, Mannaerts GP, Hiltunen JK (2006): Localization of a portion of the liver isoform of fatty-acid-binding protein (L-FABP) to peroxisomes. *Biochem J* 394: 475-84

Arthur JM, Janech MG, Varghese SA, Almeida JS, Powell TB (2008): Diagnostic and prognostic biomarkers in acute renal failure. *Contrib Nephrol* 160: 53-64

Augustine JJ, Sandy D, Seifert TH, Paganini EP (2004): A randomized controlled trial comparing intermittent with continuous dialysis in patients with ARF. *Am J Kidney Dis* 44: 1000-7

Baenkler HW, Fitze D, Fießl HS: *Innere Medizin*. Thieme, Stuttgart 2001

Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N (2007): Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 431-9

Bagshaw SM, George C, Bellomo R (2008a): A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1569-74

Bagshaw SM, George C, Bellomo R (2008b): Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care* 12: R47

Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N (2009): Timing of renal replacement therapy and clinical outcomes in critically ill patients with severe acute kidney injury. *J Crit Care* 24: 129-40

Bairaktari E, Liamis G, Tsolas O, Elisaf M (2001): Partially reversible renal tubular damage in patients with obstructive jaundice. *Hepatology* 33: 1365-9

Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, Platt R (2001): Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int* 60: 1452-9

- Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Beltrame A, Pisano L, D'Amico G (2001): Urinary excretion of IgG and alpha(1)-microglobulin predicts clinical course better than extent of proteinuria in membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 38: 240-8
- Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M, D'Amico G (2002): Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1890-6
- Beddhu S, Samore MH, Roberts MS, Stoddard GJ, Ramkumar N, Pappas LM, Cheung AK (2003): Impact of timing of initiation of dialysis on mortality. *J Am Soc Nephrol* 14: 2305-12
- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C (2004a): Defining acute renal failure: physiological principles. *Intensive Care Med* 30: 33-7
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P (2004b): Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 8: R204-12
- Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J (2007): The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 1223-43
- Bock HA (1998): Pathophysiology of acute renal failure in septic shock: from prerenal to renal failure. *Kidney Int Suppl* 64: S15-8
- Bonomini V, Feletti C, Stefoni S, Vangelista A (1986): Early dialysis and renal transplantation. *Nephron* 44: 267-71
- Bouman CS, Oudemans-Van Straaten HM, Tijssen JG, Zandstra DF, Kesecioglu J (2002): Effects of early high-volume continuous venovenous hemofiltration on survival and recovery of renal function in intensive care patients with acute renal failure: a prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 30: 2205-11
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Carmichael P, Carmichael AR (2003): Acute renal failure in the surgical setting. *ANZ J Surg* 73: 144-53
- Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ (2003): Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13537-42
- Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW (2005): Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 16: 3365-70
- Chmurzynska A (2006): The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 47: 39-48

Connors AF, Jr., Speroff T, Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Jr., Wagner D, Desbiens N, Goldman L, Wu AW, Califf RM (1996): The effectiveness of right heart catheterization in the initial care of critically ill patients. SUPPORT Investigators. *JAMA* 276: 889-97

Delanaye P, Krzesinski JM, Cavalier E, Lambermont B (2007): The RIFLE criteria: are the foundations robust? *Crit Care Med* 35: 2669; author reply 2669-70

de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, Takala J, Sprung C, Cantraine F (2000): Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 26: 915-21

Demirkilic U, Kuralay E, Yenicesu M, Caglar K, Oz BS, Cingoz F, Gunay C, Yildirim V, Ceylan S, Arslan M (2004): Timing of replacement therapy for acute renal failure after cardiac surgery. *J Card Surg* 19: 17-20

Devarajan P (2007): Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 27: 637-51

Diderichs O: Funktionelles und strukturelles akutes Nierenversagen in der operativen Intensivmedizin. Med. Diss. Münster 2007

Dihazi H, Müller GA (2007): Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. *Expert Rev Proteomics* 4: 39-50

Dihazi H, Asif AR, Agarwal NK, Doncheva Y, Muller GA (2005): Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle's loop (TALH) cells. *Mol Cell Proteomics* 4: 1445-58

Dihazi H, Müller GA, Lindner S, Meyer M, Asif AR, Oellerich M, Strutz F (2007): Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients. *Clin Chem* 53: 1636-45

Dihazi H, Dihazi GH, Nolte J, Meyer S, Jahn O, Müller GA, Engel W (2009): Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach. *J Proteome Res* 8: 5497-510

Dishart MK, Kellum JA (2000): An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of acute renal failure. *Drugs* 59: 79-91

Doi K, Noiri E, Sugaya T (2010): Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. *Curr Opin Crit Care* 16: 545-9

Druml W (2007): Prävention und Therapie des akuten Nierenversagens: Bedeutung metabolischer Intervention. *Wien Klin Wochenschr* 119: 201-4

Elahi MM, Lim MY, Joseph RN, Dhannapuneni RR, Spyt TJ (2004): Early hemofiltration improves survival in post-cardiotomy patients with acute renal failure. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 1027-31

- Eravci M, Fuxius S, Broedel O, Weist S, Eravci S, Mansmann U, Schluter H, Tiemann J, Baumgartner A (2007): Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 7: 513-23
- Faber K, Hvidberg V, Moestrup SK, Dahlback B, Nielsen LB (2006): Megalin is a receptor for apolipoprotein M, and kidney-specific megalin-deficiency confers urinary excretion of apolipoprotein M. *Mol Endocrinol* 20: 212-8
- Ferguson MA, Vaidya VS, Waikar SS, Collings FB, Sunderland KE, Gioules CJ, Bonventre JV (2010): Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int* 77: 708-14
- Gettings LG, Reynolds HN, Scalea T (1999): Outcome in post-traumatic acute renal failure when continuous renal replacement therapy is applied early vs. late. *Intensive Care Med* 25: 805-13
- Gibney RT, Bagshaw SM, Kutsogiannis DJ, Johnston C (2008): When should renal replacement therapy for acute kidney injury be initiated and discontinued? *Blood Purif* 26: 473-84
- Glatz JF, van der Vusse GJ (1996): Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 35: 243-82
- Gruberg L, Mintz GS, Mehran R, Gangas G, Lansky AJ, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Leon MB (2000): The prognostic implications of further renal function deterioration within 48 h of interventional coronary procedures in patients with pre-existent chronic renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol* 36: 1542-8
- Haller M, Schelling G (2000): Akutes Nierenversagen. Pathophysiologie-klinische Beurteilung-Therapie. *Anaesthesist* 49: 349-52
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV (2002): Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62: 237-44
- Han WK, Waikar SS, Johnson A, Betensky RA, Dent CL, Devarajan P, Bonventre JV (2008): Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 73: 863-9
- Han WK, Wagener G, Zhu Y, Wang S, Lee HT (2009): Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 873-82
- Hauerland NH, Spener F (2004): Fatty acid-binding proteins-insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res* 43: 328-49
- Hayashida N, Chihara S, Akasu K, Oda T, Tayama E, Kai E, Kawara T, Aoyagi S (2000): Plasma and urinary levels of heart fatty acid-binding protein in patients undergoing cardiac surgery. *Jpn Circ J* 64: 18-22
- Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A (2004): Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 66: 1115-22

Herget-Rosenthal S, Pietruck F, Volbracht L, Philipp T, Kribben A (2005): Serum cystatin C -a superior marker of rapidly reduced glomerular filtration after uninephrectomy in kidney donors compared to creatinine. *Clin Nephrol* 64: 41-6

Herold G et. al.: *Innere Medizin*. Eigenverlag, Köln 2011

Hörl WH, Wanner C: *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis*. Thieme, Stuttgart 2004

Hoste EA, Kellum JA (2007): Incidence, classification, and outcomes of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 156: 32-8

Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, Kellum JA (2006): RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care* 10: R73

Huang H, Starodub O, McIntosh A, Atshaves BP, Woldegiorgis G, Kier AB, Schroeder F (2004): Liver fatty acid-binding protein colocalizes with peroxisome proliferator activated receptor alpha and enhances ligand distribution to nuclei of living cells. *Biochemistry* 43: 2484-500

Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M (1998): Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273: 4135-42

Joannidis M (2007): Classification of acute kidney injury: are we there yet? *Intensive Care Med* 33: 572-4

John S, Eckardt KU (2007): Renal replacement strategies in the ICU. *Chest* 132: 1379-88

Jorres A, Frei U (2001): Akutes Nierenversagen. *Internist (Berl)* 42: 379-88, 390-402

Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hikawa A, Hirano N, Hirata Y, Goto A, Omata M (2004a): Urinary fatty acid-binding protein as a new clinical marker of the progression of chronic renal disease. *J Lab Clin Med* 143: 23-30

Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Okada M, Okumura F, Yamanouchi M, Honda A, Okabe M, Fujino T, Hirata Y (2004b): Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol* 165: 1243-55

Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, Numabe A, Takagi M, Hayakawa H, Tabei F (2006): Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem* 284: 175-82

Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Obama A, Hiroi J, Miura H, Watanabe M, Kumai T, Ohtani-Kaneko R, Hirata K, Kimura K (2006): Liver-type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* 169: 1107-17

Karsou SA, Jaber BL, Pereira BJ (2000): Impact of intermittent hemodialysis variables on clinical outcomes in acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 35: 980-91

- Kazmi WH, Gilbertson DT, Obrador GT, Guo H, Pereira BJ, Collins AJ, Kausz AT (2005): Effect of comorbidity on the increased mortality associated with early initiation of dialysis. *Am J Kidney Dis* 46: 887-96
- Keller H (1991): [The use of laboratory data]. *Schweiz Med Wochenschr* 121: 1861-9
- Kellum JA (2008): Acute kidney injury. *Crit Care Med* 36: S141-5
- Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N (2002): Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 8: 509-14
- Kierdorf HP (2000): Aktuelle Aspekte der extrakorporalen Nierenersatztherapie. *Internist* 41: 1062-70
- Kierdorf HP (2006a): Organversagen Niere: Diagnostik und Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 131: 2475-9
- Kierdorf HP (2006b): Sepsis und akutes Nierenversagen. *Intensivmedizin* 43: 175-88
- Kierdorf HP (2008): Kontinuierliche Nierenersatztherapie in der Behandlung des akuten Nierenversagens: Geschichte und Entwicklung. *Intensivmedizin* 45: 194-204
- Killingsworth LM (1982): Clinical applications of protein determinations in biological fluids other than blood. *Clin Chem* 28: 1093-102
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lafitte D, Dussol B, Andersen S, Vazi A, Dupuy P, Jensen ON, Berland Y, Verdier JM (2002): Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin Biochem* 35: 581-9
- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R (2005): Acute renal failure. *Lancet* 365: 417-30
- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R (2006): The rise of prevalence and the fall of mortality of patients with acute renal failure: what the analysis of two databases does and does not tell us. *J Am Soc Nephrol* 17: 923-5
- Lassalle M, Labeeuw M, Frimat L, Villar E, Joyeux V, Couchoud C, Stengel B (2010): Age and comorbidity may explain the paradoxical association of an early dialysis start with poor survival. *Kidney Int* 77: 700-7
- Lassnigg A, Schmidlin D, Mouhieddine M, Bachmann LM, Druml W, Bauer P, Hiesmayr M (2004): Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study. *J Am Soc Nephrol* 15: 1597-605
- Lee RS, Monigatti F, Briscoe AC, Waldon Z, Freeman MR, Steen H (2008): Optimizing sample handling for urinary proteomics. *J Proteome Res* 7: 4022-30

Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993): A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270: 2957-63

Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI (1996): The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *JAMA* 275: 1489-94

Levy MM, Macias WL, Vincent JL, Russell JA, Silva E, Trzaskoma B, Williams MD (2005): Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med* 33: 2194-201

Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ (2007): Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 18: 904-12

Liano F, Pascual J (1996): Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 50: 811-8

Liano F, Junco E, Pascual J, Madero R, Verde E (1998): The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int Suppl* 66: S16-24

Liu KD, Himmelfarb J, Paganini E, Ikizler TA, Soroko SH, Mehta RL, Chertow GM (2006): Timing of initiation of dialysis in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 915-9

Lopes JA, Fernandes P, Jorge S, Goncalves S, Alvarez A, Costa e Silva Z, Franca C, Prata MM (2008): Acute kidney injury in intensive care unit patients: a comparison between the RIFLE and the Acute Kidney Injury Network classifications. *Crit Care* 12: R110

Luhn S, Berth M, Hecker M, Bernhardt J (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 3: 1117-27

Maatman RG, Van Kuppevelt TH, Veerkamp JH (1991): Two types of fatty acid-binding protein in human kidney. Isolation, characterization and localization. *Biochem J* 273 ( Pt 3): 759-66

Maatman RG, van de Westerlo EM, van Kuppevelt TH, Veerkamp JH (1992): Molecular identification of the liver- and the heart-type fatty acid-binding proteins in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Biochem J* 288 ( Pt 1): 285-90

Magistrini R, Ligabue G, Lupo V, Furci L, Leonelli M, Manganelli L, Masellis M, Gatti V, Cavazzini F, Tizzanini W (2009): Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. *Nephrol Dial Transplant* 24: 1672-81

Manjunath G, Sarnak MJ, Levey AS (2001): Prediction equations to estimate glomerular filtration rate: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 785-92

McCullough PA, Soman SS (2005): Contrast-induced nephropathy. *Crit Care Clin* 21: 261-80



- Mehta RL, McDonald B, Gabbai FB, Pahl M, Pascual MT, Farkas A, Kaplan RM (2001): A randomized clinical trial of continuous versus intermittent dialysis for acute renal failure. *Kidney Int* 60: 1154-63
- Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Chertow GM (2002): Diuretics, mortality, and nonrecovery of renal function in acute renal failure. *JAMA* 288: 2547-53
- Mehta RL, McDonald B, Gabbai F, Pahl M, Farkas A, Pascual MT, Zhuang S, Kaplan RM, Chertow GM (2002): Nephrology consultation in acute renal failure: does timing matter? *Am J Med* 113: 456-61
- Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM (2004): Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int* 66: 1613-21
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A (2007): Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11: R31
- Melnikov VY, Molitoris BA (2008): Improvements in the diagnosis of acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 19: 537-44
- Mendelssohn DC, Mullaney SR, Jung B, Blake PG, Mehta RL (2001): What do American nephrologists think about dialysis modality selection? *Am J Kidney Dis* 37: 22-29
- Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, Lang T, Ploder J, Lenz K, Le Gall JR, Druml W (2002): Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 30: 2051-8
- Miguet L, Bogumil R, Decloquement P, Herbrecht R, Potier N, Mauvieux L, Van Dorselaer A (2006): Discovery and identification of potential biomarkers in a prospective study of chronic lymphoid malignancies using SELDI-TOF-MS. *J Proteome Res* 5: 2258-69
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P (2003): Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14: 2534-43
- Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P (2004): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 24: 307-15
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J (2005): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365: 1231-8
- Moers C, Varnav OC, van Heurn E, Jochmans I, Kirste GR, Rahmel A, Leuvenink HG, Squifflet JP, Paul A, Pirenne J (2010): The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome. *Transplantation* 90: 966-73

Müller GA, Müller CA, Dihazi H (2007): Clinical proteomics-on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 22: 1297-300

Nakamura T, Sugaya T, Node K, Ueda Y, Koide H (2006): Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis* 47: 439-44

Nakamura T, Sugaya T, Koide H (2007): Angiotensin II receptor antagonist reduces urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with diabetic nephropathy and chronic renal failure. *Diabetologia* 50: 490-2

Nakamura T, Sugaya T, Koide H (2009): Urinary liver-type fatty acid-binding protein in septic shock: effect of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion. *Shock* 31: 454-9

Negishi K, Noiri E, Sugaya T, Li S, Megyesi J, Nagothu K, Portilla D (2007): A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int* 72: 348-58

Ostermann M, Chang RW (2009): Correlation between parameters at initiation of renal replacement therapy and outcome in patients with acute kidney injury. *Crit Care* 13: R175

Ostermann M, Chang RW (2011): Challenges of defining acute kidney injury. *QJM* 104: 237-43

Overberger P, Pesacreta M, Palevsky PM (2007): Management of renal replacement therapy in acute kidney injury: a survey of practitioner prescribing practices. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 623-30

Oyama Y, Takeda T, Hama H, Tanuma A, Iino N, Sato K, Kaseda R, Ma M, Yamamoto T, Fujii H (2005): Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules. *Lab Invest* 85: 522-31

Palevsky PM (2006): Epidemiology of acute renal failure: the tip of the iceberg. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 6-7

Palevsky PM (2007): Clinical review: timing and dose of continuous renal replacement therapy in acute kidney injury. *Crit Care* 11: 232

Palevsky PM (2008): Indications and timing of renal replacement therapy in acute kidney injury. *Crit Care Med* 36: S224-8

Palevsky PM, Baldwin I, Davenport A, Goldstein S, Paganini E (2005): Renal replacement therapy and the kidney: minimizing the impact of renal replacement therapy on recovery of acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 11: 548-54

Parikh CR, Devarajan P (2008): New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 36: S159-65

Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL (2004): Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* 43: 405-14

- Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL (2005): Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol* 16: 3046-52
- Pelsers MM (2008): Fatty acid-binding protein as marker for renal injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 241: 73-7
- Pelsers MM, Morovat A, Alexander GJ, Hermens WT, Trull AK, Glatz JF (2002): Liver fatty acid-binding protein as a sensitive serum marker of acute hepatocellular damage in liver transplant recipients. *Clin Chem* 48: 2055-7
- Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF (2005): Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 352: 15-35
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-67
- Piccinni P, Dan M, Barbacini S, Carraro R, Lieta E, Marafon S, Zamperetti N, Brendolan A, D'Intini V, Tetta C (2006): Early isovolaemic haemofiltration in oliguric patients with septic shock. *Intensive Care Med* 32: 80-6
- Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, Makusky AJ, Mondal M, Seonarain M, Field E, Schatz CR, Estock MA, Ahmed N (2004): Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 4: 1159-74
- Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E, Devarajan P (2008): Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 73: 465-72
- Praught ML, Shlipak MG (2005): Are small changes in serum creatinine an important risk factor? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 265-70
- Prescott GJ, Metcalfe W, Baharani J, Khan IH, Simpson K, Smith WC, MacLeod AM (2007): A prospective national study of acute renal failure treated with RRT: incidence, aetiology and outcomes. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2513-9
- Ricci Z, Ronco C, D'Amico G, De Felice R, Rossi S, Bolgan I, Bonello M, Zamperetti N, Petras D, Salvatori G (2006): Practice patterns in the management of acute renal failure in the critically ill patient: an international survey. *Nephrol Dial Transplant* 21: 690-6
- Ronco C, Bellomo R, Homel P, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, La Greca G (2000): Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 356: 26-30
- Rui Z, Jian-Guo J, Yuan-Peng T, Hai P, Bing-Gen R (2003): Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics* 3: 433-9

Samtleben W, Blumenstein M (1999): Indikation und Auswahl der Dialyseverfahren bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz einschließlich kontinuierlicher Verfahren. Internist (Berl) 40: 3-12

Saudan P, Niederberger M, De Seigneux S, Romand J, Pugin J, Perneger T, Martin PY (2006): Adding a dialysis dose to continuous hemofiltration increases survival in patients with acute renal failure. Kidney Int 70: 1312-7

Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF (1998): Fatty acid-binding proteins in the heart. Mol Cell Biochem 180: 43-51

Schiffel H, Lang SM, Fischer R (2002): Daily hemodialysis and the outcome of acute renal failure. N Engl J Med 346: 305-10

Seabra VF, Balk EM, Liangos O, Sosa MA, Cendoroglo M, Jaber BL (2008): Timing of renal replacement therapy initiation in acute renal failure: a meta-analysis. Am J Kidney Dis 52: 272-84

Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, Moretti E, Nguyen HB, Gunnerson KJ, Milzman D (2009): A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. Crit Care Med 37: 96-104

Simon TC, Roth KA, Gordon JI (1993): Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the liver fatty acid-binding protein gene (Fabpl) that regulate its cell lineage-specific, differentiation-dependent, and spatial patterns of expression in the gut epithelium and in the liver acinus. J Biol Chem 268: 18345-58

Sohmiya K, Tanaka T, Tsuji R, Yoshimoto K, Nakayama Y, Hirota Y, Kawamura K, Matsunaga Y, Nishimura S, Miyazaki H (1993): Plasma and urinary heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in coronary occlusion and reperfusion induced myocardial injury model. J Mol Cell Cardiol 25: 1413-26

Srisawat N, Hoste EE, Kellum JA (2010): Modern classification of acute kidney injury. Blood Purif 29: 300-7

Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM (2003): A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. Proteomics 3: 601-9

Stel VS, Dekker FW, Ansell D, Augustijn H, Casino FG, Collart F, Finne P, Ioannidis GA, Salomone M, Traynor JP (2009): Residual renal function at the start of dialysis and clinical outcomes. Nephrol Dial Transplant 24: 3175-82

Storch J, Thumser AE (2000): The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1486: 28-44

Streich JH (2009): Rheumatoide Arthritis: Proteomische Analyse von Serum und synovialen Fibroblasten zur Detektion von Biomarkern. Rer.nat.Diss. Göttingen 2009

- Tattersall J, Greenwood R, Farrington K (1995): Urea kinetics and when to commence dialysis. *Am J Nephrol* 15: 283-9
- Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB (2002): Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 62: 1461-9
- Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kanlaya R (2006): Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J Proteome Res* 5: 183-91
- Timms JF, Cramer R (2008): Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 8: 4886-97
- Traynor JP, Simpson K, Geddes CC, Deighan CJ, Fox JG (2002): Early initiation of dialysis fails to prolong survival in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 13: 2125-32
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E (2005): Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 294: 813-8
- Uehlinger DE, Jakob SM, Ferrari P, Eichelberger M, Huynh-Do U, Marti HP, Mohaupt MG, Vogt B, Rothen HU, Regli B (2005): Comparison of continuous and intermittent renal replacement therapy for acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1630-7
- Veerkamp JH, van Moerkerk HT (1993): Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol Cell Biochem* 123: 101-6
- Villa P, Jimenez M, Soriano MC, Manzanares J, Casasnovas P (2005): Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care* 9: R139-43
- Vinsonneau C, Camus C, Combes A, Costa de Beauregard MA, Klouche K, Boulain T, Pallot JL, Chiche JD, Taupin P, Landais P (2006): Continuous venovenous haemodiafiltration versus intermittent haemodialysis for acute renal failure in patients with multiple-organ dysfunction syndrome: a multicentre randomised trial. *Lancet* 368: 379-85
- Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee HT (2006): Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 105: 485-91
- Waikar SS, Liu KD, Chertow GM (2008): Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 844-61
- Weinberger SR, Dalmasso EA, Fung ET (2002): Current achievements using ProteinChip Array technology. *Curr Opin Chem Biol* 6: 86-91
- Wessel D, Flugge UI (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-3
- Westermeier R (2004): Isoelectric focusing. *Methods Mol Biol* 244: 225-32

Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmelfarb J, Collins AJ (2006): Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *J Am Soc Nephrol* 17: 1135-42

Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H (2007): Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 18: 2894-902

Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, Hu X, Chawla L, Shen RF, Knepper MA (2006): Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 70: 1847-57

Zimmerman AW, Veerkamp JH (2002): New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 59: 1096-116

## 9 Anhang

Dr. med Harry Mattes  
Abteilung Nephrologie und Rheumatologie  
Universitätsklinik Göttingen

Robert-Koch Straße 40  
37075 Göttingen

Tel: 0551-398509  
Fax: 0551-398507  
e-mail: HarryMattes@gmx.de  
Pieper: 919-2242

An:  
den Vorsitzenden der Ethik-Kommission der  
Universitätsklinik Göttingen  
Herrn Prof. Dr. Rüter

Göttingen, 23.März.05

Betr.: **Antragsnummer 12/3/05** "Frühe Urin- und Serummarker des Akuten  
Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektroskopie"  
Antragsteller Dr. H. Mattes

Sehr geehrter Herr Prof. Rüter, sehr geehrte Damen und Herren,

vielen Dank für Ihre Bemühungen und Hinweise. Ich habe die von Ihnen vorgeschlagenen  
Korrekturen durchgeführt und übersende Ihnen hiermit eine aktuelle Fassung.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Harry Mattes

Anlagen:  
Kopie des geänderten Aufklärungsbogens

## Studientitel

“Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektroskopie“

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie UKG

Prof. Dr. med. G.A. Müller, Abteilungsleiter: Wissenschaftliche Beratung

Dr. H. Dihazi, Biochemiker und Dr. med. H. Mattes, Arzt: Studienleitung und Antragsteller

Dr. med. Bramlage, Dr. med. Godehardt, Dr. med. Koschnick, Dr. med. Mattes, Dr. med. Scheel, Dr. med. Wittauer : Prüfärzte

## Einleitung

### Klinischer Hintergrund

Bei ca. 5% aller Patienten tritt während eines Krankenhausaufenthaltes ein akutes Nierenversagen (ANV) auf (Star 1998). Das Auftreten dieser Komplikation verschlechtert die Prognose des Patienten erheblich (Novis et al. 1994). Zur Diagnosestellung des ANV werden zur Zeit die Diurese, der Verlauf der Nierenretentionswerte und das Urinsediment beurteilt (Marcussen et al. 1995). Einheitlich festgelegte Kriterien bestehen nicht.

Abhängig vom Zeitdauer und Stärke einer Noxe, kommt es zunächst zum (partiellen) Funktionsverlust und anschließend zum Strukturverlust der Nieren, der Akuten Tubulusnekrose (ATN). Die ATN lässt sich klinisch durch einen charakteristischen Befund im Urinsediment diagnostizieren (Marcussen et al. 1995) und entspricht einer Nekrose der renalen Tubulusepithelien.

Kann die auslösende Noxe nach einer ATN identifiziert und beseitigt werden, beträgt die Regeneration der Nieren etwa 14 Tage. Innerhalb dieser Zeit muss häufig eine Nierenersatztherapie durchgeführt werden. Zusätzlich bestehen erhebliche Risiken für das Auftreten sekundärer Komplikationen (Marcussen et al. 1995, Star 1998).

Trotz der Verfügbarkeit von Methoden zur Nierenersatztherapie (NET) ist insbesondere das Auftreten des ANV auf einer Intensivstation weiterhin mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität betroffener Patienten assoziiert (Star 1998).

Die Ursachen hierfür sind unklar. Folgende Ursachen müssen diskutiert werden:

1. Die schwere der Grunderkrankung bleibt limitierend.
2. Bei Indikationsstellung zur Nierenersatztherapie auf dem Boden “klassischer Kriterien“ (Kreatin, Harnstoff-N, Überwässerungszeichen, pH und Elektrolytentgleisungen) sind bereits für den Verlauf entscheidende pathophysiologische Vorgänge eingetreten, d.h. die NET wird zu spät eingeleitet.
3. Wesentliche pathophysiologische Vorgänge können durch die NET nicht durchbrochen werden.

Innerhalb der Studie soll insbesondere der Punkt 2. mit Hilfe der ProteinChip Technologie (SELDI: surface enhanced laser desorption ionisation) bearbeitet werden.



Die "klassischen Kriterien" zum Beginn einer NET entstammen im Wesentlichen der Indikationsstellung zur chronischen Dialyse. Da die Pathophysiologie und die Dynamik des Akuten Nierenversagens grundsätzlich vom chronischen Nierenversagen verschieden sind, ist zu erwarten, dass diese nicht notwendigerweise auf die Situation des ANV übertragen werden können. Nur wenige Studien befassen sich mit dem optimalen Zeitpunkt zum Beginn der NET bei ANV. Gettings et al. konnten bei traumatologischen Patienten mit ANV einen verkürzten Verlauf und eine niedrigere Mortalität bei Patienten feststellen, bei denen bei Therapiebeginn niedrigere Harnstoff-N-Werte vorlagen (Gettings et al. 1999). In einer prospektiven Studie an postoperativen thoraxchirurgischen Patienten zeigte sich ebenso ein Vorteil für die "frühe" Behandlungsgruppe (Demirkilic et al. 2004). Wiederum an thoraxchirurgischen Patienten konnte gezeigt werden, dass das Mortalitätsrisiko deutlich mit der postoperativen Anstiegsgeschwindigkeit des Serumkreatinins korreliert (Lassing et al. 2004).

Diese Daten deuten darauf hin, dass der Diagnose- bzw. der Behandlungszeitpunkt bei ANV frühzeitig erfolgen sollte.

Leider gibt es keinen *verlässlichen* Marker, der eine sichere Unterscheidung zwischen im Verlauf dialysepflichtigem ANV und passagerer Nierenfunktionsstörung (z.B. infolge intravasalen Volumenmangels) zulässt. Für die Durchführung einer prophylaktischen NET gibt es keinerlei Daten.

Das Auftreten einer ATN macht eine Dialysepflichtigkeit im Verlauf wahrscheinlich, kann je nach Ursache jedoch erst spät am Auftreten von entsprechenden Urin-Sedimentbefunden diagnostiziert werden (Marcussen et al. 1995). Daher wäre ein früher Marker einer drohenden oder eingetretenen renalen Tubulusnekrose klinisch und zur Planung von Interventionsstudien nützlich (Metha et al. 2002).

Im Rahmen einer klinischen Anwendung sollte es mit einem "ANV-Marker" möglich sein, Risikopatienten zu identifizieren um durch entsprechende Therapieanpassung die Ausbildung einer vollständigen ATN zu verhindern.

Innerhalb von Interventionsstudien kann ein derartiger Marker zur Indikationsstellung einer NET herangezogen werden, um zu testen ob durch frühzeitigen NET-Einsatz das "Outcome" der Patienten zu verbessert werden kann; insbesondere wenn sich auslösende(n) Noxe(n) nicht beseitigen lassen (z.B. schwerer Schock, pulmonale Diffusionsstörung mit Hypoxämie etc.).

In der jüngeren Vergangenheit wurden einige Marker in Studien getestet. Die Konzentration von "Kidney Injury Moleküle-1" (KIM-1) im Urin zeigt eine gute Korrelation mit dem Auftreten einer ATN (Han et al. 2002). Der Konzentrationsanstieg geht dem Auftreten von Sedimentveränderungen deutlich voraus. Der Marker scheint sich jedoch ausschließlich zum Nachweis einer ischämischen ATN zu eignen. Die Interleukin-18 (IL-18) Konzentration im Urin korreliert gut mit dem Auftreten einer ATN verschiedenster Ursachen (Parikh et al. 2004). Allerdings geht aus den Daten nicht hervor, ob durch eine IL-18-Konzentrations-Bestimmung im Urin die Diagnose einer irreversiblen oder schwerwiegenden Tubuluschädigung früher erfolgen könnte als durch die konventionelle Urinsediment-Mikroskopie. Die Nutzbarkeit anderer bisher getesteter Urin-Marker zur Frühdiagnose der (drohenden) ATN wie z.B. Actin, Interleukin-6 oder -12 ist ebenso nicht ausreichend belegt (Rabb 1998, Known 2003). An einer kleinen Patientenzahl konnte gezeigt werden, dass sich möglicherweise über die Bestimmung tubulärer Enzymaktivitäten im Urin frühzeitig das Risiko eines Patienten für das Auftreten eines Akuten Nierenversagens abschätzen lässt (Westhuyzen et al. 2003). Allerdings war in dieser Studie die untersuchte Patientenzahl gering. Keiner dieser Patienten musste einer NET unterzogen werden und die Häufigkeit einer ATN wurde nicht bestimmt.

Ein Problem stellt das *anurische* Nierenversagen dar. Bei anhaltender Anurie ist die Diagnose des Akuten Nierenversagens klinisch einfach. Eine ätiologische Abklärung und prognostische Einstufung und damit zielgerichtete Therapie(anpassung) auf der Grundlage des Urinbefundes ist jedoch nicht möglich. Daher wäre die Identifikation eines Serum-Markers der alternativ oder komplementär zur Urin-Untersuchung hinweise auf den Verlauf eines ANV geben könnte ein weiterer Ansatzpunkt. Die *klassischen* Nierenretentionswerte im Serum (Kreatinin, Harnstoff) korrelieren nur bedingt mit der renalen Funktion (Coll et al. 2000).

### Labortechnischer Hintergrund

Mit der Proteinmassenspektroskopie (PMS), MALDI-TOF-MS (Matrix assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry) steht eine Methode zur Verfügung mit der verschiedenste Proteine und Peptide in einem Arbeitsgang abgebildet werden können (Karas, Hillenkamp 1988). Die Methode ist in unserem Labor etabliert.

Im Wesentlichen werden "Proteingemische" in einem Vakuum mittels LASER ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Zeit bis zum Auftreffen der Fragmente auf einen Detektor korreliert mit deren Ladung und Molekulargewicht. Die so entstehenden Massenspektren können direkt oder mittels Software verglichen werden. ([http://www.matrixscience.com/search\\_intro.html](http://www.matrixscience.com/search_intro.html)). Mit dieser Methode ist es also möglich, unterschiede in der Proteinzusammensetzung zweier oder mehrerer Proben festzustellen und zu charakterisieren.

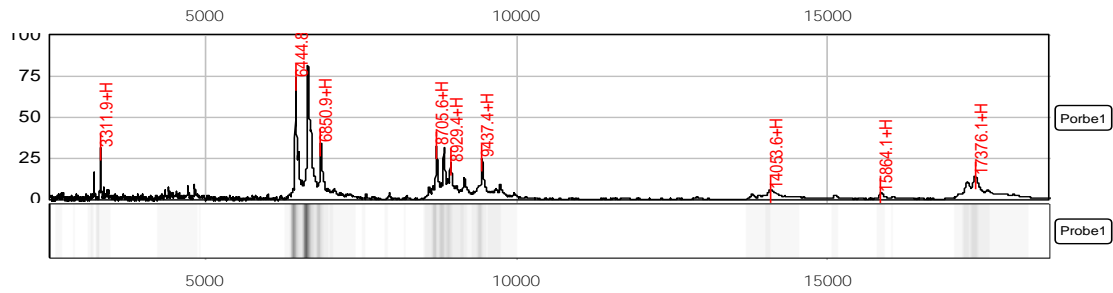
Mittels weiterführender und auf der Massenspektroskopie aufbauender Methoden können den Unterschieden, die sich als "Peak" in der Flugzeit-Kurve darstellen, bestimmten bekannten Proteinen zugeordnet werden. Im einfachsten Fall gelingt dies über eine Datenbankrecherche über das berechnete Molekulargewicht (<http://www.matrixscience.com>). Bei mehreren möglichen Proteinen, kann nach Proteintrennung (z.B. durch HPLC, Gelelektrophorese o.ä.) ein enzymatischer Verdau der Probenanalyse vorgeschaltet werden und das Protein anhand des entstehenden Peptid-Massenspektrums und einer erneuten Datenbankrecherche ([http://www.matrixscience.com/search\\_intro.html](http://www.matrixscience.com/search_intro.html)) oft eindeutig identifiziert werden (Pappin 1997).

Mittels SELDI-TOF-MS (Surface enhanced laser desorption/ionisation – time of flight – mass spectroscopy) steht zusätzlich die Möglichkeit zur Verfügung, einen reproduzierbaren "Schnelltest" zu entwickeln (Weinberger et al. 2001), mit dem die Ergebnisse weiter verifiziert und ggf. für weitergehende Studien genutzt werden könnten. Am Ende der Entwicklung würde dann die Etablierung einer in der Routine anwendbaren Labormethode (z.B. ein ELISA) stehen.

Die Proteinanalyse mittels SELDI-TOF-MS basiert auf einer Chip-Technologie. Ihre Anwendung ist gut zur vergleichenden Analyse großer Probenzahlen geeignet. Potentielle Markerproteine können schnell entdeckt, validiert und identifiziert werden. Die Methode bietet sich z.B. für die Analyse von Urin- und Serum-Proteinen bei Patienten mit akutem Nierenversagen an und ermöglicht eine schnelle und direkte Analyse.

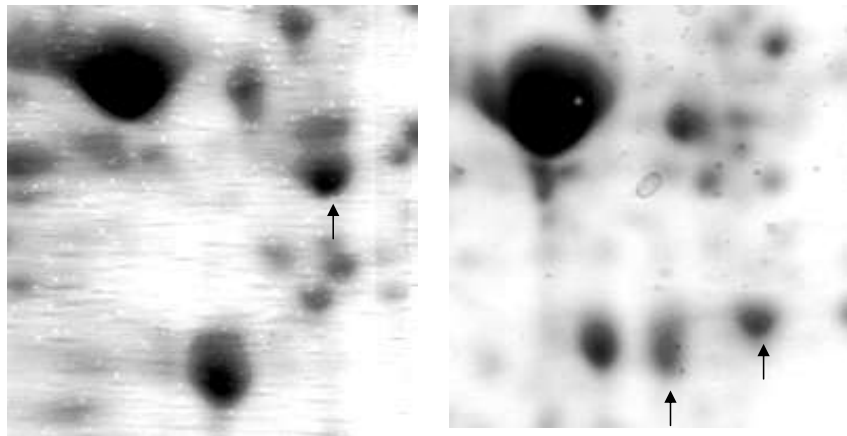
Die Auftragspunkte ("spots") der Probenträger (Protein-Chip-Arrays) bestehen aus chromatographischen Materialien und interagieren als stationäre Phase direkt mit dem Analysematerial. Vor der Analyse im Protein-Chip-Reader, einem Time-of-Flight Massenspektrometer (TOF-MS), werden nicht gebundenen Substanzen durch Waschen von den Spots der "Arrays" gelöst. Der massenspektroskopischen Analyse geht eine Fraktionierung der Proben voraus, deren Selektivität vom Typ des Protein-Chip-Arrays und dem gewählten Waschpuffer abhängt ("reverse-phase chromatography").

Abbildung 1 zeigt beispielhaft das Massenspektrum einer Serumprobe nach Proteins Selektion mittels "reverse-phase-chromatography".



**Abbildung 1:** Serumprotein-Profiling. Das Ergebnis kann als Massenspektrogramm (oben) oder als Gelelektrophorese-Äquivalent (unten) dargestellt werden.

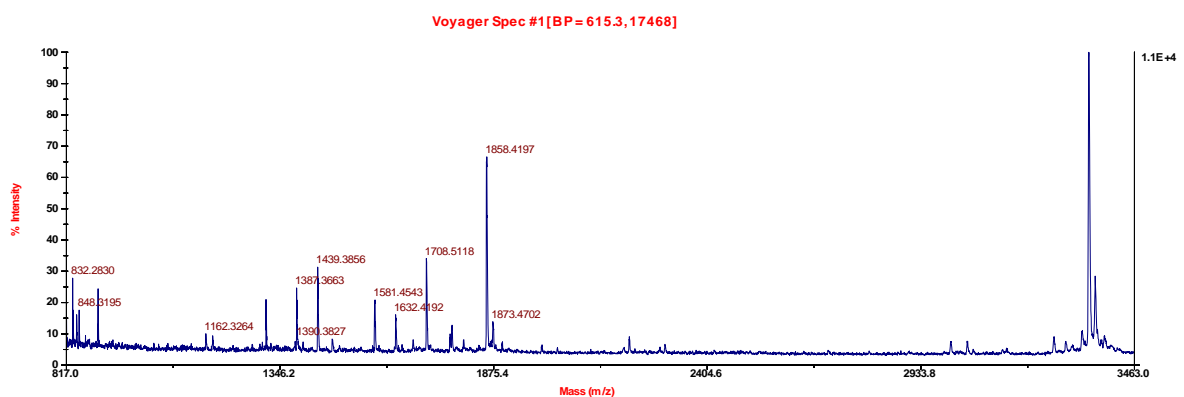
Ergänzend weist die 2D-Gelelektrophorese eine bessere Auflösung bei Proteinen mit einem Molekulargewicht > 40 kDa auf (Abbildung 2).



**Abbildung 2**

2D-Protein-Gelelektrophorese vor (li.) und nach (re.) Stimulation von renalen Tubuluszellen. Neue "Protein-Spots" wurden anschließend durch MALDI-TOF-Analyse analysiert.

Eine Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF-MS wird durch den sog. "Protein-Massen-Fingerprint" möglich. Darunter versteht man die Liste der Peptid-Massen, die aus einem Protein bei sequenzspezifischer Spaltung mittels Protease (z.B. Trypsin) entstehen (Henzel et al., 1993). Der "Peptidmassen-Fingerprint" kann über spezielle Algorithmen zur Identifizierung des Ausgangsproteins benutzt werden (Henzel et al. 1993, Mann et al.). Die Methode wurde bereits erfolgreich für die Proteinidentifizierung nach Gelelektrophorese (Patterson et al.), HPLC getrennten Proteinen (Elicone et al. 1994) oder nach Affinitätschromatographie angewandt (Nakanishi et al.; Brockman et al.).



**Abbildung 3** :Nach Proteintrennung mittels 2D Gelelektrophorese und Protease-Spaltung eines Serumproteins, wurde mit Hilfe von MALDI-TOF-MS der "Protein-Massenfingerprint" ermittelt. Anhand der Peptidfragment-Massen konnte durch Datenbanksuche (Software „Mascot“ , <http://www.matrixscience.com>) das Protein als Transthyretin identifiziert werden.

### **Problemstellung**

- Es soll versucht werden, mittels der SELDI-Technik Proteine und Peptide zu identifizieren und zu charakterisieren, die als früher Marker eines im Verlauf Dialysepflichtigen akuten Nierenversagens genutzt werden könnten.
- Entsprechend der Einleitung soll dies sowohl anhand einer Urinanalyse als auch der Serumproteinanalyse erfolgen

### **Studienprotokoll**

#### **Patienten**

Alle Patienten die im UKG behandelt werden können in die Studie eingeschlossen werden. Der Studienumfang ist offen. Die Rekrutierung von Patienten ist abgeschlossen, wenn mindestens 30 Patienten mit im Verlauf dialysepflichtigem ANV (NET-Gruppe) und mindestens 30 Patienten mit im Verlauf nicht dialysepflichtigem Nierenversagen eingeschlossen sind (Kontrollgruppe). Erwartungsgemäß wird die Kontrollgruppe deutlich größer sein als die NET-Gruppe. Die theoretische Mindestzahl beträgt 60 Patienten. Der Zeitrahmen zur Rekrutierung liegt vermutlich bei ca. 2 Jahren. Der Einschluss eines Patienten erfolgt durch einen der o.g. Prüfärzte.

#### **Ausschlusskriterien**

- Der Patient lehnt die Teilnahme an der Studie ab.
- Es besteht eine chronische Niereninsuffizienz mit Serum-Kreatinin-Werten von über 2,5mg/dl

#### **Einschlusskriterien**

Patienten bei denen ein ANV vermutet wird, oder bei denen erhebliche Risiken bestehen im weiteren Verlauf ein dialysepflichtiges ANV zu entwickeln können für die Studie rekrutiert werden. Da die Studie einen nicht invasiven Charakter hat und bis auf die zusätzliche Mitabnahme weniger Blutproben (s.u.) keine Beeinträchtigung des Patienten zur Folge hat, werden die Einschlusskriterien bewusst großzügig formuliert und sind nur als Richtlinie zu verstehen. Als Anhaltspunkt zum Einschluss gelten folgende Situationen

- Ein Serum-Kreatininanstieg von mehr als 0,5mg/dl im Vergleich zu einem Vorwert der nicht älter als eine Woche ist.
- Ein aktueller Kreatinin-Vorwert liegt nicht vor, es ist jedoch dem letzten zur Verfügung stehenden Vorwert möglicherweise eine Nierenschädigung eingetreten (z.B. durch Medikamente/Kontrastmittel, Blutdruckabfall/Schock o.ä.)
- Der Patient ist oligurisch (Diurese kleiner 500ml/d) oder es bestehen klinische Zeichen der Überwässerung
- Bei dem Patienten besteht oder bestand in den letzten 12h vor Einschluss ein Kreislaufchock.
- Bei dem Patienten besteht ein Volumenmangel oder dieser kann aufgrund der Klinik oder Anamnese vermutet werden.

### **Patientenaufklärung und Einwilligung**

Die Aufklärung des Patienten erfolgt durch einen der o.g. Prüfarzte entsprechend dem Aufklärungsformular. Ist der Patient nicht in der Lage die Einwilligung selbst zu geben, entscheidet der gesetzliche Betreuer oder ein nahestehender Angehöriger über die Teilnahme an der Studie entsprechend dem mutmaßlichen Willen des Patienten. In dieser Situation kann davon ausgegangen werden, dass ein dauerhafter Zugang zur Blutentnahme und ein Blasendauerkatheter vorhanden sind. Patienten, bei denen der mutmaßliche Wille nicht durch Befragung des gesetzlichen Vertreters oder nahestehender Angehöriger eruiert werden kann, werden nicht in die Studie eingeschlossen.

Sollte sich im Verlauf die Möglichkeit einer nachträglichen Einwilligung durch den Patienten selbst ergeben, wird diese wahrgenommen. Lehnt der Patient die Teilnahme nachträglich ab, werden die abgenommenen Blut- und Urinproben vernichtet und alle Daten über den Patienten aus der Studien-Datenbank gelöscht. Der Patient wird als nicht eingeschlossen betrachtet.

### **Studienablauf und Dokumentation**

Die Dokumentation erfolgt zum einen über einen Studienordner und zum Anderen über eine Studiendatenbank. Der Studienablauf wird mit Hilfe von Formblättern und Checklisten standardisiert.

#### **Tag 0:**

Der Tag des Einschlusses eines Patienten wird als Tag 0 bezeichnet

Am Tag 0 wird eine Studienakte mit Einwilligungserklärung angelegt, in der alle Studienbezogenen Daten (s. Checkliste) über den Patienten gesammelt werden. Grundlegende Patientendaten zur Vorgeschichte und zum aktuellen Verlauf werden erhoben. Insbesondere werden Informationen zur renalen Funktion dokumentiert (Serum-Kreatinin, Harnstoff-N, Kreatinin-Clearance etc.). Die Gabe von nephrotoxischen Substanzen in den letzten 14 Tagen vor Einschluß wird recherchiert.

Die an Tag 0 durchzuführenden Standard Laboruntersuchungen können der u.g. Checkliste "Einschluss" entnommen werden. Zu Studienzwecken werden zusätzlich 3 ml Blut und 10 ml Urin zur späteren Proteinmassenspektroskopie entnommen, zentrifugiert und der Überstand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Urin wird zusätzlich mit einem mit einem Proteinaseinhibitor versetzt.

### **Verlaufsbeurteilung, wiederholte Probenabnahme zur PMS**

An den Tagen 2, 5, 8 usw. wird anhand klassischer Verlaufsparameter (Serum-Kreatinin, Cystatin C, Harnstoff-N, Diurese, Urinsediment) und der Klinik eine Verlaufsbeurteilung vorgenommen. Ist es zum Abfall von Harnstoff-N und/oder des Kreatinins um 25% unterhalb des maximal festgestellten Wertes gekommen oder sind die Werte über 3 Tage stabil kann die Beobachtung des Patienten abgebrochen werden. Eine Weiterbeobachtung wird insbesondere jedoch dann erfolgen, wenn nach klinischer Einschätzung der Gesamtsituation dennoch im Verlauf eine Dialysebehandlung notwendig werden könnte.

An den Tagen 2,5,8 usw. wird bis zum Beobachtungsende erneut eine 3ml Blut- und Urinprobe zur Proteinmassensektroskopie entnommen.

Kann aufgrund der im Verlauf wiederholt durchgeführten Urinsediment-Mikroskopie von einer eingetreten ATN ausgegangen werden, muß überprüft werden dass für den gleichen Tag eine 3ml Blutprobe und eine Urinprobe zur PMS vorhanden ist. Sind für den betreffenden Tag keine entsprechenden Proben vorhanden, müssen diese zusätzlich abgenommen werden.

## Beobachtungsende

Die Beobachtung der Patienten endet, wenn

- sich die Nierenfunktion bessert und die Notwendigkeit einer NET in den nächsten Tagen unwahrscheinlich wird oder
- Eine NET notwendig wird (primärer Endpunkt)

Die bis zum Beobachtungsende mindestens täglich durchzuführenden Laboruntersuchungen sind der Checkliste "Verlauf" zu entnehmen. Die Tests entsprechen dem üblichen diagnostischen vorgehen bei V.a. ANV.

## Primärer Endpunkt: Durchführung einer NET

Die Indikation zur und Durchführung einer NET (Dialyse, Hämofiltration) stellt den primären Endpunkt der Studie dar.

Vor und Während und nach Durchführung der Behandlung werden erneut Proben zur PMS gewonnen. Die Entnahmemodalitäten sind in der Checkliste "NET" festgelegt.

## Auswertung und Statistik

Primäres Studienziel:

Das Auftreten veränderter Protein-Massenspektrogramme aus Serum und Urin am Tag 0 (2,5,7 usw.) wird mit der Notwendigkeit einer NET korreliert. Da eine Quantifizierung von Proteinen mit der verwendeten Methode nur eingeschränkt möglich ist, wird im Wesentlichen nach Signalen gesucht, die ausschließlich in der NET-Gruppe auftreten. Veränderungen die bei mindestens 80% Patienten aufgetreten sind und bei weniger als 20% der Kontrollgruppe zu finden sind, sollen zunächst beschrieben und näher charakterisiert werden.

Eine Zwischenanalyse wird nach dem Einschluss von je 6 neuen Patienten in der NET Gruppe durchgeführt.

## Sekundäres Studienziel:

Die gefundenen Massenspektrogramme sollen mit dem Verlauf *klassischer* Nierenfunktionsparameter und den bestehenden Grunderkrankungen korreliert werden. Die Veränderungen des Serum-Proteinmassenspektrums während der ersten NET bei ANV sollen beschrieben werden. Zu Kontrollzwecken wird auch Dialysat/Filtrat analysiert.

## Finanzierung, Versicherung

Derzeit stehen keine Drittmittel zur Durchführung der Studie zur Verfügung. Ein DFG-Antrag ist in Vorbereitung. Bei nicht invasivem Charakter der Studie wurde keine Versicherung abgeschlossen.

## Literatur

Bywaters G.G., Beale D.: Crush injuries and renal Function; B. M. J. 1941: 427-32

Coll E., Botey A., Alvarez L., Poch E., Quinto L., Saurina. A., Vera M., Piere C., Darnell A.: Serum Cystatin C as a new marker for noninvasiv estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment; Am. J. Kidney Dis. 2000 (1), 29-34.

Demirkilic U., Kuralay E., Yenicesu M., Caglar K., Oz B.S., Cinngoz F, Gunay C.,Yildirim V., Ceylan S., Arslan M., Vural A., Tatar H.; Timing of replacement therapy for acute renal failure after cardiac surgery; J. Card. Surg. 2004 (19), 17-20.

Gettings L.G., Reynolds H.N., Scalea T.: Outcome in post-traumatic acute renal failure when continuous renal replacement therapy is applied early vs. late; *Intensive Care Medicine* 1999 (25), 805-813.

Karas M., Hillenkamp F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons; *Anal. Chem.* 1988 (60), 2299-2301

Known O., Molitoris B.A., Pescovitz M., Kelly K.J.: *Am. J. Kidney Dis.* 2003 (41), 1074-1087.

Lassnigg A., Schmidlin D., Mouhieddine M., Bachmann L.M., Druml W., Bauer P., Hiesmayr M.: Minimal changes of serum Creatinin predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study; *J. Am. Nephrol.* (15), 1597-1605.

Marcussen N., Schumann J., Campell P., Kjelstrand C.: Cytodiagnostic urinalysis is very useful in the differential diagnosis of acute renal failure and can predict severity; *Ren. Fail.* 1995 (17) 721-729.

Han W.K., Bailly Y., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J.V.: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002 (62), 237-244.

Metha R.L., McDonald B., Gabbai F.: Nephrology consultation in acute renal failure: Does Timing matter ?; *Am. J. Med.* 2002 (113), 456-461.

Novis B.K., Roizen M.F., Aronson S., Thisted R.A.: Association of postoperative risk factors with postoperative acute renal failure. *Anesth. Analg.* 1994 (778), 143-149

Pappin DJ: Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry; *Methods Mol Biol*, 1997 (64), 165-173.

Parikh C.R., Jani A., Melnikov V.Y., Faubel S., Edelstein C.L.: Urinary Interleukin-18 is a Marker of human acute tubular necrosis; *Am. J. Kidney Dis.* 2004 (43), 405-414.

Rabb H.: Evaluation of urinary Markers in acute renal failure; *Curr. Opin. Nephrol.* 1998 (7), 681-685.

Star R.A.: Treatment of acute renal failure; *Kidney Int.* 1998 (54), 1817-1831

Weinberger SR, Dalmaso EA, Fung ET: Current achievements using ProteinChip Array technology; *Curr Opin Chem Biol*, 2001 (6), 86-91.

Westhuyzen J., Endre Z.E., Reece G., Reith D.M., Saltissi D., Morgan, T.J.: Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit; *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003 (18), 543-551.

**Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-  
Massenspektrometrie**

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr. G.A. Müller  
Studienleitung Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker

**Checkliste und Verlaufsbogen "Einschluss"  
Tag 0**

Der Patient ist aufgeklärt und die Einwilligungserklärung liegt vor  Datum: _____	Patientenaufkleber
--	--------------------

Stationäre Aufnahme am: _____ Station: _____ Aufnahmegrund:  Wesentliche Begleiterkrankungen:   Nephrotoxische Substanzen in den letzten 14 Tagen (Tagesdosis, Datum):
Aktuelle Kreatinin Vorwerte mit Datum und Quelle (HA=Hausarzt, ZL=Zentrallabor):
Medikamente:



**Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektrometrie**

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr.G.A. Müller

Studienleitung Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker

**Checkliste und Verlaufsbogen "Einschluss"**

**Tag 0**

**Laboruntersuchungen**

Untersuchung/Labor	Blut	Ergebnis	Urin	Ergebnis
Proteinmassen-Spektroskopie (wird von Station abgeholt)				
<b>Nephro-Labor: Dr. Dihazi</b>				
	3ml EDTA-Monovette	[ ] <b>Abgenommen</b> , mit Datum gekennzeichnet	10ml Urin-Monovette, Spontanurin	[ ] <b>Abgenommen</b> , mit Datum gekennzeichnet
Nephrologisches Routine-Labor (wird von Station abgeholt)				
	Cystatin C	[ ] <b>Abgenommen</b>	U-Status U-Sediment Proteinurie Spontanurin (IL-6/12)	[ ] <b>Abgenommen</b> [ ] <b>Befunde kopiert</b>
			24h-Sammelurin	[ ] <b>Angeordnet</b>
			Proteinurie	[ ] <b>Befund kopiert</b>
			Kreatinin-Clearance	ml/min oder mg/dl
			Urinmenge	ml/24h
Zentrallabor	Heparinat-Blut (orange)	[ ] <b>Angeordnet</b>	10ml Urin-Monovette, Spontanurin	[ ] <b>Angeordnet</b>
	Kreatinin	mg/dl	Kreatinin	mg/dl
	Harnstoff-N	mg/dl	Harnstoff-N	mg/dl
	Albumin	g/dl	Albumin	g/dl
	Na	mmol/l	Na	mmol/l
	K	mmol/l	K	mmol/l
	AP	U/l	AP	U/l
	gGT	U/l	gGT	U/l
	LDH	U/l	LDH	U/l
	CRP	mg/dl		
<b>Anordnungen in der Kurve:</b>				
Bilanz (E/A) oder	___/___ ml	[ ] <b>Angeordnet</b>		
Einfuhrkontrolle + tägl. Gewicht	___ ml/ ___ kg	[ ] <b>Angeordnet</b>		
Studienhinweisblatt		[ ] <b>Angebracht</b>		
Sonstiges				
Stationsarzt(e)/Pfleger informiert		[ ] <b>Durchgeführt</b>		

<b>Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektrometrie</b> Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr.G.A.Müller Studienleitung Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker	Patientenaufkleber
--	--------------------

Checkliste und Verlaufsbogen "Verlauf": Tag \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Untersuchung/Labor	Blut	Ergebnis	Urin	Ergebnis
<b>Tägliche Bestimmungen</b>				
Zentrallabor				
	Kreatinin	mg/dl		
	Harnstoff-N	mg/dl		
	K	mmol/l		
<b>Bestimmungen an den Tagen 1,2,5,8,11,14 usw.</b>				
Nephrologisches Routine-Labor			(Spontan)	
			U-Status	<input type="checkbox"/> Befund kopiert
			U-Sediment	<input type="checkbox"/> Befund kopiert
<b>Bestimmung an den Tagen 2, 5, 8, 11, 14 usw.</b>				
Proteinmassen-Spektroskopie (wird von Station abgeholt) Nephro-Labor: Dr. Dihazi				
	3ml EDTA-Monovette	<input type="checkbox"/> Abgenommen	10 ml Urin-Monovette	<input type="checkbox"/> Abgenommen
Nephrologisches Routine-Labor				
	Cystatin C	mg/dl	24h-Urin	Sammelmenge: _____ ml
			Proteinurie	<input type="checkbox"/> Befund kopiert
			Kreatinin	<input type="checkbox"/> Befund kopiert
Zentrallabor			(Spontanurin)	
	AP	U/l	AP	U/l
	gGT	U/l	gGT	U/l
	LDH	U/l	LDH	U/l
	Na	mmol/l	Na	mmol/l
	Albumin	g/dl	Kreatin	mg/dl
	CRP	mg/dl	Harnstoff-N	mg/dl
<b>Klinik (täglich)</b>				
Bilanz vom Vortag	ml			
Diurese am Vortag	ml			
Überwässerung hat zugenommen	Ja / Nein	Begründung:		
Urämie / Vigilanzminderung	Ja / Nein	Beschreibung:		
Exsiccose	Ja / Nein			
Blasendauerkatheter	Ja / Nein			
Antibiose	Ja / Nein	Präparate/Dosis:		
Weiterbeobachtung nötig ?	Ja / Nein	Begründung:		

**Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektrometrie**

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr. G.A. Müller

Studienleitung Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker

Tel. 0551-398509 Pieper 919-2242 Handy e-mail: harrymattes@gmx.de

Checkliste und Verlaufsbogen

“Nierenersatztherapie“

Patientenaufkleber

Tag : \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Indikation zur Nierenersatztherapie :		
	Blut in 3ml-EDTA-Monovette	Dialysat in 10ml EDTA-Monovette
<b>Dialyse und IVVH</b>		
Vor Dialysebeginn	[ ] Abgenommen	
30 Minuten nach Beginn	[ ] Abgenommen	
1h nach Dialysebeginn		[ ] Abgenommen
15 Minuten vor Ende	[ ] Abgenommen	[ ] Abgenommen
<b>CVVH</b>		
Vor Behandlungsbeginn	[ ] Abgenommen	
3 h nach Behandlungsbeginn	[ ] Abgenommen	[ ] Abgenommen
21 h nach Behandlungsbeginn	[ ] Abgenommen	[ ] Abgenommen
<b>BGA vor Behandlung</b>		
	pH	
	pCO <sub>2</sub>	mmHg
	pO <sub>2</sub>	mmHg
	sBic	mmol/
	FiO <sub>2</sub>	%
	Hb	g/dl

**Patientenaufklärungsbogen:  
Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels  
Protein-Massenspektrometrie**

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr. G.A. Müller  
Studienleitung: Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker  
Tel. 0551-398509 Pieper 919-2242 Handy e-mail: harrymattes@gmx.de



Lieber Patient, liebe Patientin!

Wir möchten Sie um die Teilnahme an einer Studie bitten. Die Teilnahme ist freiwillig. Ein Ablehnen an der Teilnahme wird keinen Einfluss auf Ihre Behandlung oder andere Nachteile für Sie haben. Sie können jederzeit Ihre Einverständniserklärung ohne Nennung von Gründen widerrufen.

Bei Ihnen wurde eine Verschlechterung der Nierenfunktion festgestellt. Die Nierenfunktionsverschlechterung ist meistens vorübergehend. Bei einem kleinen Teil der Patienten mit derartigen Veränderungen hält die Nierenfunktionseinschränkung jedoch länger an. In diesem Fall ist es nötig, eine Nierenersatztherapie (z.B. eine oder mehrere Dialysen = "Blutwäschen") durchzuführen, um die Nierenfunktion vorübergehend zu ersetzen. Nach gegenwärtigem Stand der Forschung muss davon ausgegangen werden, dass Patienten die im Verlauf mit diesem Verfahren behandelt werden müssen, davon profitieren würden, wenn die Behandlung möglichst früh erfolgt.

Leider gibt es momentan keinen Laborwert der eine Vorhersage erlaubt, ob sich die Nierenfunktion rechtzeitig wieder erholen wird oder eine Nierenersatztherapie eingeleitet werden muss.

In unserem Labor sind wir mit einem modernen Verfahren in der Lage in einem Arbeitsgang eine Vielzahl unterschiedlicher Eiweißstoffe nachzuweisen (Proteinmassenspektroskopie). Wir hoffen, dass es uns gelingt mit diesem Verfahren Stoffe aufzuspüren, die in der Lage sind uns die Schwere von akuten Nierenfunktionseinschränkungen schnell anzuzeigen.

Hierzu werden an der Universitätsklinik Göttingen mindestens 60 Patienten mit plötzlich aufgetretener Nierenfunktionsstörung untersucht. Je nach Verlauf Ihrer Nierenerkrankung würden wir Sie um die Abgabe von Urin- und Blutproben bitten in denen nach solchen Stoffen gesucht werden kann.

Wir würden zusätzlich zu den in dieser Situation notwendigen täglichen Blutentnahmen heute (Studienbeginn) und dann je nach Verlauf spätestens alle 3 Tage 3ml Blut und 10ml Urin ausschließlich zu Studienzwecken abnehmen.

Sollte es nicht gelingen, Ihre Nierenfunktion zu stabilisieren und eine Nierenersatztherapie (z.B. Dialyse) notwendig werden, würden wir gerne 3 weitere Blutproben (je 3ml) entnehmen (unmittelbar vor, während und unmittelbar nach der Behandlung). Zu Kontrollzwecken würden wir auch gerne sog. Dialysat bzw. Filtrat untersuchen. Hierbei handelt es sich um eine Lösung, die Stoffe enthält, die Ihnen bei der Behandlung entzogen werden. Normalerweise wird das Dialysat/Filtrat verworfen. Eine zusätzliche Belastung entsteht Ihnen dadurch nicht.

Die Beobachtungszeit endet, wenn sich entweder die Nierenfunktion deutlich gebessert hat oder nach dem Durchführen der ersten Nierenersatztherapie (z.B. Dialyse). Die genaue Dauer der Beobachtung und die Anzahl der nötigen Blutentnahmen lassen sich leider im Voraus nicht genau angeben. Erfahrungsgemäß muss von einer Beobachtungsdauer von 3 bis 12 Tagen ausgegangen werden. Es wären also zwischen 2 und 5 zusätzliche Blutentnahmen und

ebenso viele Urinproben nötig, wenn keine Nierenersatztherapie durchgeführt werden muss, sowie 3 weitere Blutentnahmen im Falle einer Nierenersatztherapie.

Die Auswertung der Studie und die Veröffentlichung der Ergebnisse in Fachzeitschriften erfolgt anonym. Sie werden insbesondere nicht namentlich erwähnt. Zum Zwecke der Auswertung ist es nötig, Ihre Daten in elektronischer Form zu speichern. Selbstverständlich werden die Daten vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben. Weiterhin würden wir Kopien von für die Studie wichtigen Teilen Ihrer Krankenakte anfertigen und gesondert aufbewahren. Sie haben jederzeit die Möglichkeit in Ihre Studiendaten einzusehen. Nach Abschluss der Studie erhalten Sie eine allgemeinverständliche Zusammenfassung der Ergebnisse.

**Einwilligungserklärung:****“Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektrometrie“**

Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universität Göttingen, Prof. Dr. G.A. Müller

Studienleitung: Dr. Harry Mattes, Arzt und Dr. Hassan Dihazi, Biochemiker

Tel. 0551-398509 Pieper 919-2242 Handy e-mail: harrymattes@gmx.de



Patientenaufkleber

Ich, \_\_\_\_\_ erkläre mich bereit an der o.g. Studie teilzunehmen. Mir ist bekannt, dass die Teilnahme **freiwillig** ist. Ich kann meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen. Nachteile, insbesondere in Hinblick auf meine weitere Behandlung, werden mir hierdurch nicht entstehen.

Mit der Abgaben von Proben (Blut, Urin und Dialysat/Filtrat) zu Studienzwecken wie im Aufklärungsbogen angegeben bin ich einverstanden. **Mir ist weiterhin bekannt, dass Daten über mich zu Studienzwecken gesondert in elektronischer Form gespeichert werden** und bin damit einverstanden. Eine Datenweitergabe an Dritte erfolgt nicht. Mir ist bekannt, dass ich mein Einverständnis zur Speicherung meiner persönlichen Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen.

Ein Aufklärungsbogen wurde mir ausgehändigt.

Unterschriften:

Patient: \_\_\_\_\_ Göttingen, Datum \_\_\_\_\_

[ ] Ich wünsche eine schriftliche Information über das Ergebnis der Studie an die o.g. Adresse.

**Bei nicht einwilligungsfähigen Patienten:**

Sie bestätigen mit Ihrer Unterschrift, dass die Teilnahme an der Studie nach Ihrem besten Wissen dem mutmaßlichen Willen des Patienten entspricht.

Gerichtlich bestellter Betreuer: \_\_\_\_\_ Göttingen, Datum \_\_\_\_\_

Angehöriger des Patienten: \_\_\_\_\_ Göttingen, Datum \_\_\_\_\_

Verhältnis zum Patienten (z.B. Kind, Bruder, Schwester): \_\_\_\_\_

Arzt \_\_\_\_\_ Göttingen, Datum \_\_\_\_\_

Studientitel

“Frühe Urin- und Serummarker des Akuten Nierenversagens: Analyse mittels Protein-Massenspektroskopie“

Unterschriften zur Einreichung des Studienprotokolls an die Ethik-Kommission der UKG

Prof. Dr. med. G.A. Müller, Abteilungsleiter  
Abteilung Nephrologie und Rheumatologie UKG

Göttingen den

Dr. med. H. Mattes  
Abteilung Nephrologie und Rheumatologie UKG

Göttingen den

Dr. H. Dihazi  
Abteilung Nephrologie und Rheumatologie UKG

Göttingen den

Auf eine Unterschrift durch die benannten Prüffärzte wird an dieser Stelle verzichtet. Vor Einschluss eines Patienten in die Studie bescheinigt der/die Ärztin den Erhalt und das Verständnis des Studienprotokolls. Die Bescheinigung ist Bestandteil des Studienordners.

## **Danksagung**

Ich möchte mich zuallererst bei Herrn Prof. Dr. med. G. A. Müller dafür bedanken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. rer. nat. Hassan Dihazi bedanken, der mir das Thema dieses Projektes freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat und mich während der langen Zeit durch seine intensive Betreuung und die vielen Gespräche sehr unterstützt und sich immer für mich eingesetzt hat.

Dankbar bin ich auch Dr. med. Harry Mattes, auf dessen Idee diese Arbeit beruht und der mich sowohl zur Durchführung dieses Projektes begeistert hat als auch anfangs den klinischen Part betreute. Diese Aufgabe wurde anschließend von PD Dr. med. Koziolk übernommen. Er hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und war mir dank seiner großartigen klinischen Erfahrung eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Klaus Jung bedanken, der sich mit großem Einsatz um Betreuung des statistischen Teils dieser Arbeit gekümmert hat.

Ein großer Dank gilt Dr. rer. nat. Jan-Hendrik Streich. Er war mir während der ganzen Zeit ein guter Freund und half mir oftmals bei Auswegen bei Rückschlägen, die solch eine Arbeit mit sich bringt.

Des Weiteren gebührt Dr. Daniel Heiser von der anästhesiologischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen mein Dank, der mir sehr bei der Patientenrekrutierung geholfen hat.

Zudem möchte ich mich bei dem Team der Proteomics Einheit der UMG bedanken, allen voran bei Elke Brunst-Knoblich, die mir bei der Einarbeitung und Durchführung meiner Arbeit stets zur Seite stand. Hierbei möchte ich auch Ivana Pesic danken, die für mich in den letzten Zügen der Arbeit eine große Hilfe war. Mein Dank gilt auch Gry Dihazi, Bettina Buchmaier und Souad Bazra, die mir während des Laboralltages eine gute Stütze waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Team des Routinelabors unter der Leitung von Dr. Wessels, und PD Dr. Abdul R. Asif, der einen großen Anteil an der Identifizierungsarbeit hatte.

Des Weiteren möchte ich meinen Studienkollegen danken, die mich in schweren Situationen angespornt haben, weiter zu machen. Durch sie habe ich nie aufgegeben.

Mein größter Dank schließlich gilt meinen Eltern, die mir mein Studium und diese Dissertation erst ermöglicht und mich immer in Allem unterstützt haben.



## **Lebenslauf**

Ich, Rabi Raj Datta, wurde am 08.10.1982 als Sohn von Ram Lal und Sipra Datta, geborene Roy, in Kassel geboren.

In Kassel besuchte ich von 1989 bis 1993 die Grundschule und wechselte im Jahr 1993 auf das Friedrichsgymnasium Kassel, wo ich meine allgemeine Hochschulreife mit dem Abitur im Jahre 2002 erlangte.

Im Rahmen des Zivildienstes arbeitete ich beim Hessischen Landesamt für Umwelt und Geologie im Bereich Strahlenschutz.

Im Wintersemester 2003/2004 immatrikulierte ich mich zum Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, an der ich im September 2005 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand. Im Februar 2009 begann ich mein praktisches Jahr. In den ersten beiden Tertialen, in denen ich die Fächer Chirurgie und Anästhesie wählte, arbeitete ich im Krankenhaus Hospital de Santa Maria in Lissabon, Portugal. Das dritte Tertial, Innere Medizin, führte ich im jetzigen Ameos Klinikum Alfeld durch.

Den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im April 2010 und beendete das Studium im Sommer 2010.