

Aus der Medizinischen Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Isolierung und Identifizierung urämischer Substanzen aus
Adsorbereluaten der Prometheusstudie mittels chromatographischer
und massenspektrometrischer Verfahren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Buntins
(geb. Kühne)

aus Brandenburg an der Havel

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I-III
Abkürzungsverzeichnis	IV-VI
1. Abstrakt.....	1
1.1. Abstract.....	2
2. Einleitung	3
2.1. Niere	3
2.2. Chronische Niereninsuffizienz	4
2.2.1. Definition	4
2.2.2. Epidemiologie	5
2.2.3. Ätiologie.....	5
2.2.4. Symptome.....	7
2.2.5. Diagnostik	7
2.2.6. Therapie.....	9
2.3. Dialyseverfahren.....	10
2.3.1. Allgemein	10
2.3.2. Hämodialyse.....	10
2.3.3. Hämofiltration	11
2.3.4. Hämodiafiltration	11
2.3.5. Peritonealdialyse	12
2.4. Urämietoxine	13
2.5. Funktionsweise des Prometheus [®] -Systems	16
2.5.1. Evaluierung der Abtrennleistung des Prometheus [®] -Systems.....	17
2.6. Zielsetzung der Arbeit	18
2.7. Methoden	19
2.7.1. Grundlagen der Chromatographie.....	19
2.7.2. Anwendungsgebiete der Chromatographie	19
2.7.3. Aufbau einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage.....	19
2.7.4. Umkehrphasenchromatographie.....	21
2.7.5. Ionenchromatographie.....	22
2.7.6. Anionenaustausch-Chromatographie	22
2.7.7. Kationenaustausch-Chromatographie	23
2.7.8. Massenspektrometrie.....	23

2.7.9.	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	24
3.	Methodik	26
3.1.	Durchführung der Behandlung mit dem Prometheus [®] -System.....	26
3.2.	Aufreinigung des hydrophoben Adsorbers (Adsorber 1)	27
3.2.1.	Elution der Substanzen von dem Adsorber 1	27
3.2.2.	Deproteinierung mit Perchlorsäure	28
3.2.3.	Herstellung des Lösungsmittels	28
3.2.4.	Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Einstufen-Gradienten.....	28
3.2.5.	Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten.....	29
3.2.6.	Präparative Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	29
3.2.7.	Präparative Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	30
3.2.8.	Entsalzung mit Reversed Phase Chromatographie.....	30
3.2.9.	Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten.....	31
3.2.10.	Analytische Reversed Phase Chromatographie	31
3.2.11.	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie	32
3.3.	Aufreinigung des anionischen Adsorbers (Adsorber 2)	33
3.3.1.	Elution der Substanzen von dem Adsorber 2	33
3.3.2.	Deproteinierung mit Perchlorsäure	34
3.3.3.	Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Einstufen-Gradienten.....	34
3.3.4.	Chromatographische Aufarbeitung	34
3.3.5.	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie.....	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Allgemein	35
4.2.	Ergebnisse Adsorber 1	35
4.2.1.	Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	35
4.2.2.	Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	37
4.2.3.	Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten.....	38
4.2.4.	Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten	40
4.2.5.	Analytische Reversed Phase Chromatographie.....	42
4.2.6.	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	43
4.2.7.	Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit MassBank	44
4.2.8.	Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit Mascot	47
4.3.	Ergebnisse Adsorber 2	48

4.3.1.	Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	48
4.3.2.	Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten	49
4.3.3.	Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten.....	51
4.3.4.	Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradient.....	52
4.3.5.	Analytische Reversed Phase Chromatographie.....	55
4.3.6.	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	56
4.3.7.	Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit MassBank	56
4.3.8.	Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit Mascot	58
5.	Diskussion	59
5.1.	Allgemein	59
5.2.	Chromatographische Analyse mittels Stufengradienten.....	60
5.3.	Chromatographische Analyse mittels Lineargradienten.....	61
5.4.	Identifizierung der an den Adsorbentien gebundenen Substanzen	62
6.	Literaturverzeichnis.....	66
7.	Anhang	73
7.1.	Tabellenverzeichnis	73
7.2.	Abbildungsverzeichnis	73
7.3.	Geräte.....	75
7.4.	Chemikalien.....	76
7.5.	Software.....	76
8.	Eidesstattliche Versicherung	77
8.1.	Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	78
9.	Lebenslauf	79
10.	Publikationsliste	81
11.	Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5D	Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz mit Dialyseinsatz
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AF	AlbuFlow
Alb	Serum-Albumin
bidest.	Bidestilliert
BUN	Harnstoff-Stickstoff
c	Stoffkonzentration
CGA	Causa (Ursache), GFR, Albuminurie
CKD	Chronische Niereninsuffizienz
CrCl	Kreatininclearance
CT	Computertomographie
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DB	Durchbruch
dl	Deziliter
E	Extinktion
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
EUTox	European Uremic Toxin Work Group
$\varepsilon(\lambda)$	Extinktionskoeffizient
FGF-23	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
FPSA	Fraktionierte Plasmaseparation und Adsorption
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HCT	High capacity ion trap
HD	Hämodialyse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IU	Internationale (engl.: Units)
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton

KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
L	Liter
LC	Liquid-Chromatographie
m	Meter
M	Molare Masse
m/z	Masse/Ladung
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mAU	Relative Absorption
MDRD	Modification of diet in renal disease
Mio	Million
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MS^n	Massenspektrum mit jeweiliger Ordnungszahl
MW	Molekülmasse
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHANES	National Health and Examination Surveys
NKF	National Kidney Foundation
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
psi	Pound-force per square inch / Einheit für Druck
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Scr	Serumkreatinin
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SPS	Smart parameter mode
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat

Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV-Abs.	Ultraviolett-Absorption
UV-Vis-Detektor	Ultraviolett-visible-Detektor
V	Volt

1. Abstrakt

Im Zuge des demographischen Wandels und der verbesserten Diagnostik nehmen die Inzidenz und die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz weltweit zu. In Deutschland wird zur Behandlung einer chronischen Niereninsuffizienz im terminalen Stadium vorwiegend die Hämodialyse eingesetzt. Bei der Verwendung dieser Dialyseform ist jedoch bekannt, dass proteingebundene Urämietoxine und Mittelmoleküle nur in unzureichendem Maße aus dem Patientenblut entfernt werden und somit ihr toxisches Potential weiter entfalten können. Aufgrund dessen ist es unerlässlich, neue Dialysetechniken mit besserer Abtrennleistung zu entwickeln. Der Einsatz adsorptiver Verfahren scheint hier eine neue Möglichkeit darzustellen. Im Rahmen der Dissertation wurde daher ein adsorptives Verfahren der Firma Fresenius-Medical Care (Prometheus[®]-System) für die Dialysebehandlung modifiziert und an fünf chronisch niereninsuffizienten Patienten einmalig getestet.

Die dabei verwendeten Adsorber 1 und 2 wurden nach der Behandlung gereinigt, die an ihnen retendierten Substanzen mit unterschiedlichen chromatographischen Verfahren isoliert und massenspektrometrisch mittels ESI-MS analysiert. Zur Identifizierung einzelner Massenspektren wurden datenbankgestützte Onlinesuchen mit MassBank und Mascot durchgeführt.

Mit der Onlinedatenbank MassBank konnten 82 unterschiedliche Substanzen identifiziert werden, von denen 53 Substanzen vom Adsorber 1 und 35 vom Adsorber 2 retendiert worden sind. Sechs der identifizierten Substanzen konnten beiden Adsorbieren zugeordnet werden. Eine weitere Substanz konnte mit der Mascotdatenbank identifiziert werden. Bei den insgesamt 83 Substanzen handelt es sich erwartungsgemäß um ein heterogenes Substanzgemisch. Darunter konnten fünf bekannte Urämietoxine (Kreatinin, Indolessigsäure, Kynurenin, Spermin und Interleukin-6) nachgewiesen werden. Einen wesentlich größeren Anteil bilden mit 39 identifizierten Substanzen jedoch die therapeutischen Metabolite, zu denen z.B. eine Fülle an Medikamenten zählen.

Die Erkenntnis, dass neben den harnpflichtigen Substanzen und schädlichen Urämietoxinen auch therapeutische Metabolite an den Adsorbieren retendieren, könnte für den geplanten klinischen Einsatz von Relevanz sein. In welchem Maße sich dieses Wissen auf die Behandlung auswirkt, ist mit dem aktuellen Kenntnisstand nur limitiert einschätzbar. Daher sollte aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation eine quantitative Bestimmung der identifizierten Substanzen erfolgen sowie die Auswertung der bisher nicht berücksichtigten Proben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass am Adsorbermaterial eine Vielzahl an unterschiedlichen Substanzen retendieren, ob dies eine Limitation für den späteren Einsatz des

Verfahrenes bei niereninsuffizienten Patienten darstellen könnte, bleibt Gegenstand gegenwärtigen Forschung.

1.1. Abstract

In the context of demographic change and better clinical diagnostic, the incidence and prevalence of chronic kidney disease has increased worldwide. In Germany patients suffering from end-stage chronic kidney disease are usually treated with hemodialysis. However it is known that through this method the removal of protein-bound uremic toxins and middle molecules is limited. The uremic toxins remain in the patient's blood and could develop their toxic potential. Therefore the development of new dialysis techniques with higher efficiency in elimination is essential. In order to achieve this, the use of adsorber techniques seems to offer great potential. Within the scope of this dissertation five patients with chronic kidney diseases were treated with a modified adsorption technique from Fresenius (the Prometheus[®]-system).

Two adsorbers were used, which were cleaned after the treatment. The bound substances were isolated with different chromatographic methods and were analysed with electrospray ionizations mass spectrometry (ESI-MS). With the help of online databases, MassBank and Mascot, several mass spectras were identified.

I identified 82 different substances with the database MassBank. 53 of those were bound to adsorber 1 and 35 to the adsorber 2. Six of the identified substances were bound to both adsorbers. Furthermore one more substance could be identified with the database Mascot. Together these 83 substances formed a very heterogeneous mixture of substances. Five uremic toxins (creatinine, indole-3-acetic acid, kynurenine, spermine and Interleukin-6) were detected among them. However the biggest part consisted of therapeutic metabolites (39 substances), which were mainly drugs.

The gained knowledge that in addition to the urinary excreted substances and the uremic toxins the therapeutic metabolites also bind to the adsorbers is really important for the intended use. At the moment it is difficult to say to what extent this knowledge will affect the treatment. Therefore, the quantitative determination of the identified substances as well as the identification of previously unrecognized samples needs to be addressed in future researchs.

In conclusion, a lot of different substances bind to the adsorbers. Whether this could lead to a limitation for the intended use as a treatment on chronic kidney disease stays the subject of current research.

2. Einleitung

2.1. Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, dessen Hauptfunktion die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen ist. Darüber hinaus ist sie an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen und Stoffwechselprozessen des Körpers beteiligt.

Die kleinste Funktionseinheit der Niere stellt das Nephron dar. Es besteht aus einem Glomerulus (Nierenkörperchen) und dem nachgeschalteten Tubulussystem (Nierenkanälchen). Im Glomerulus wird der Primärharn aus dem Blut unter Druck abfiltriert und im darauf folgenden Tubulussystem mittels Resorptions- und Sekretionsvorgängen zum Endharn konzentriert. Dieser gelangt anschließend in das Nierenbecken und wird über die Blase ausgeschieden. Eine Niere besitzt ca. 1,4 Millionen Nephrone. Die Gesamtheit aller Nephrone beider Nieren produzieren einen Primärharn von ca. 180 Liter/Tag, der auf einen Endharn von ca. 1,5 Liter/Tag konzentriert wird [1]. Das Verhältnis von Primär- zu Endharn verdeutlicht die enorme Filtrationsleistung der Niere. Einerseits wird das Blut auf diese Weise von harnpflichtigen Substanzen, wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin sowie von Fremdstoffen wie z.B. Medikamenten und Giftstoffen gereinigt, andererseits werden lebensnotwendige Bestandteile wie Blutzellen und Plasmaproteine zurückgehalten und nicht ausgeschieden. Im Tubulussystem erfolgt neben der Wasserrückresorption auch die Rückgewinnung von Substanzen wie Glukose und Aminosäuren [2, 3].

Weitere Funktionen der Niere sind die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie die Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts. Darüber hinaus zählt sie zu den endokrinen Organen, die Enzyme und Hormone produzieren und sezernieren. Somit spielt sie beispielsweise durch die Ausschüttung des Enzyms Renin und die nachfolgende Aktivierung der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation. Die Niere ist zudem der Hauptbildungsort für das Hormon Erythropoetin, das die Blutbildung stimuliert. Weiterhin wird im proximalen Tubulus das für den Calciumstoffwechsel essentielle Vitamin-D in seine aktive Form, dem Calcitriol, umgewandelt [2, 3].

Kommt es zum Verlust der Nierenfunktion, verschlechtert sich daher nicht nur die Ausscheidungsfunktion, sondern auch die endokrinen und metabolischen Funktionen. Dieser Prozess der sogenannten Niereninsuffizienz wird in eine akute und eine chronische Form eingeteilt.

Die akute Niereninsuffizienz ist als plötzlich einsetzende, rasche Abnahme der Nierenfunktion, die prinzipiell reversibel ist, definiert. Sie hält in der Regel über mehrere Tage an und ist vor allem durch die Retention von harnpflichtigen Substanzen und Störungen im Wasser-, Elektrolyt-, und Säure-Basen-Haushalt charakterisiert [4, 5]. Die akute Niereninsuffizienz wird aufgrund ihrer Ätiologie in ein prä-, intra- und postrenales Nierenversagen eingeteilt. Die Therapie richtet sich nach der Ätiologie und beinhaltet neben der Behandlung der ursächlichen Grunderkrankung die symptomatische Behandlung: zunächst durch Flüssigkeits- und Elektrolytbilanzierung, Ernährungseinschränkung und Substitution von Schleifendiuretika sowie später durch den Einsatz der Nierenersatzverfahren in Form von Dialyse [3, 4]. Im Folgenden wird aufgrund der Thematik der Dissertation die chronische Niereninsuffizienz genauer erläutert.

2.2. Chronische Niereninsuffizienz

2.2.1. Definition

Die chronische Niereninsuffizienz wurde von der amerikanischen National Kidney Foundation (NKF) im Jahr 2002 redefiniert und liegt vor, wenn ein struktureller oder funktioneller Nierenschaden, unabhängig von der Grunderkrankung, über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten besteht [6]. Dies geht mit einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion der Niere einher [4]. Im Folgenden kommt es zu einer verminderten Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten, Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt sowie zu einer veränderten Sekretion von Hormonen wie Renin, Erythropoetin, aktivem Vitamin D und Prostaglandinen. Des Weiteren können die retendierten harnpflichtigen Substanzen zu toxischen Organschäden führen [5]. Die Abnahme der Nierenfunktion kann an Hand von Nierenmarkern aus dem Blut oder Urin bestimmt werden. Aus ihnen kann die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) berechnet werden, die gleichzeitig der Stadieneinteilung einer chronischen Niereninsuffizienz dient (siehe **Tabelle 1**). Unterhalb einer GFR von $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$, auch ohne Nachweis eines Nierenschadens, spricht man von einer chronischen Niereninsuffizienz [7, 8]. Ist ein Nierenschaden bekannt, liegt auch ohne Einschränkung der GFR eine chronische Niereninsuffizienz vor. Tritt eine Albuminurie von $> 30 \text{ mg/Tag}$ (unabhängig von der GFR) auf sind die Kriterien für eine chronische Niereninsuffizienz ebenfalls erfüllt [8].

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz (modifiziert nach [8])

Stadium	GFR (ml/min/1,73m ²)	Beschreibung
1	≥ 90	Nierenschaden mit normaler oder erhöhter GFR
2	60-89	Nierenschaden mit mildem Abfall der GFR
3a	45-59	Milder bis moderater Abfall der GFR
3b	30-44	Moderater bis starker Abfall der GFR
4	15-29	Starker Abfall der GFR
5	< 15	Nierenversagen

2.2.2. Epidemiologie

Die Inzidenz und die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz nimmt in den letzten Jahrzehnten weltweit zu [9]. Coresh et al. verglichen 2007 die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz in den USA mittels der von der National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) erhobenen Daten von 1988-1994 und von 1999-2004. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 1 bis 4 von 10,0 % (1988-1994) auf 13,1 % (1999-2004) angestiegen war [10]. Das entspricht einer Prävalenzrate von 1,3 %. Des Weiteren stieg die Anzahl der Patienten mit einer chronischen Nierenersatztherapie in den USA von 209.000 im Jahr 1991 auf 472.000 im Jahr 2004 an [11]. Einen ähnlichen Trend verdeutlichen die Zahlen der Jahresberichte der Qualitäts-Sicherung Niere (QuaSi-Niere GmbH, [12]) in Deutschland. Demnach befanden sich, laut dem letzten veröffentlichten Jahresbericht, am 31.12.2006 in der Bundesrepublik Deutschland 91.718 Patienten in chronischer Nierenersatztherapie. Die Prävalenz betrug 1.114/Mio. Einwohner und die Inzidenz 213/Mio. Einwohner. Im Vergleich dazu lag die Prävalenz im Jahr 1995 in der Bundesrepublik Deutschland bei 674/Mio. Einwohnern und die Inzidenz bei 145/Mio. Einwohnern. Demnach ist ein jährlicher Anstieg der Prävalenz von 1995 bis 2006 um 4,4 % und ein Zuwachs der Inzidenz von 5,1 % zu verzeichnen [12].

2.2.3. Ätiologie

Die chronische Niereninsuffizienz kann durch eine Vielzahl von erworbenen oder angeborenen Erkrankungen hervorgerufen werden. Dabei ist die diabetische Nephropathie mit 26 % die häufigste Ursache [13]. Sie wird hauptsächlich durch einen langjährigen Diabetes mellitus Typ 2 und deutlich seltener durch den Typ 1 ausgelöst [12]. Die vaskuläre Nephropathie, auch

Nephrosklerose genannt, tritt vor allem bei Hypertonie auf und stellt den zweithäufigsten Grund dar [13]. Des Weiteren münden vor allem primäre und sekundäre Glomerulonephritiden, chronisch tubulo-interstitielle Erkrankungen und die polyzystische Nierenerkrankung in eine chronische Niereninsuffizienz. Dagegen verursachen angeborene Nierenerkrankungen oder Systemerkrankungen wie das Goodpasture Syndrom, der Lupus Erythematodes oder Vaskulitiden deutlich seltener ein chronisches Nierenversagen [13]. Aufgrund der verbesserten Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankungen sinkt ihr ursächlicher Anteil. Im Gegensatz dazu steigt die Prävalenz des Diabetes mellitus stetig an [14] und ist somit auch in Zukunft als eine häufige Ursache der chronischen Nierenerkrankung zu erwarten. Da die Prävalenz der Hypertonie sowie des Diabetes mellitus eine Altersabhängigkeit zeigt, ist im Zuge des demografischen Wandels mit einer Zunahme der Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz zu rechnen [15]. Die **Abbildung 1** gibt einen schematischen Überblick über die Häufigkeitsverteilungen der zur Niereninsuffizienz führenden Grunderkrankung bei dialysepflichtigen Patienten im Jahr 2013.

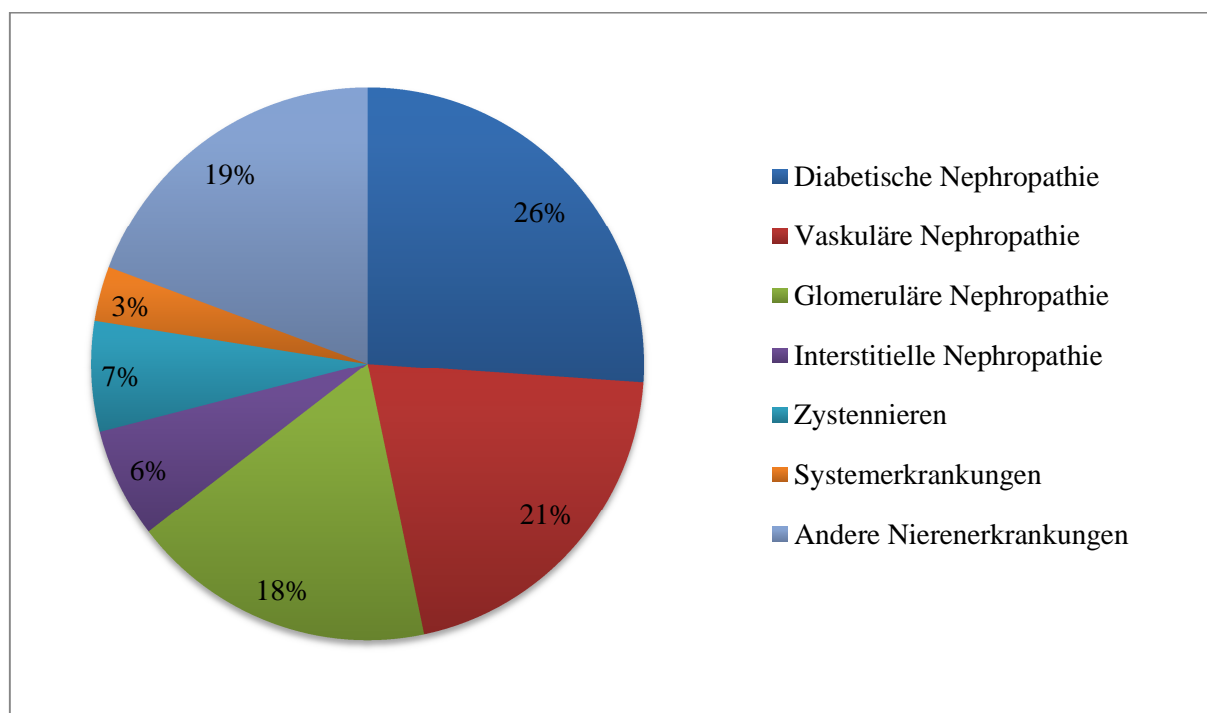


Abbildung 1: Renale Grunderkrankung der dialysepflichtigen Patienten aus dem Jahresbericht 2013 (modifiziert nach [13])

2.2.4. Symptome

Häufig ist der Verlust der Nierenfunktion ein schleichender Prozess, sodass am Anfang des Krankheitsbildes oft über unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit, Leistungsminderung und vermehrte Urinausscheidung (Polyurie) geklagt wird bzw. die Patienten asymptomatisch sind. Im fortschreitenden Krankheitsverlauf kommt es zur vermehrten Ansammlung von harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten im Organismus. Dieser Zustand wird als Urämie bezeichnet und führt zu spezifischen Symptomen. Dazu zählen unter anderem Appetitlosigkeit, Übelkeit, Juckreiz, urämischer Fötor, Blässe, erhöhter Blutdruck, Ödeme, gastrointestinale und neuromuskuläre Symptome sowie Knochenschmerzen [5]. Im Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz kann zusätzlich eine urämische Enzephalopathie, eine Perikarditis, Pleuritis, ein Lungenödem sowie eine vermehrte Blutungsneigung auftreten und bis zum Koma bzw. Tod führen [4, 5].

2.2.5. Diagnostik

Zur Diagnosestellung gibt es verschiedene diagnostische Methoden. Zum einen besteht die Möglichkeit, den Nierenschaden sonographisch oder mit anderen bildgebenden Verfahren wie Röntgen, Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT) nachzuweisen. Des Weiteren kann die Ursache der chronischen Niereninsuffizienz in manchen Fällen durch eine Biopsie geklärt werden. Deutlich häufiger wird die Diagnose jedoch aufgrund eines auffälligen Urin- bzw. Blutbefundes gestellt. Zu den Markern der chronischen Niereninsuffizienz zählt die Albuminurie, ein auffälliges Urinsediment, sowie ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate [8].

Die glomeruläre Filtrationsrate gibt das von den Glomeruli gefilterte Volumen in einer bestimmten Zeit an und ist somit ein Parameter für die Ausscheidungsfunktion der Niere. Sie lässt sich aus Berechnungen hinreichend genau abschätzen und wird im klinischen Alltag durch die Kreatininclearance (CrCl) annäherungsweise bestimmt. Zur Abschätzung der CrCl wird die Cockcroft-Gault-Formel verwendet [16]:

$$CrCl \left(\frac{ml}{min} \right) = \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht (kg)}}{72 \times \text{Serumkreatinin} \left(\frac{mg}{dl} \right)} (\times 0,85 \text{ bei Frauen})$$

Zur Berechnung der GFR wird von den Leitlinien die Verwendung der MDRD-Formel empfohlen [6, 17]

MDRD-Formel nach Levey et al. [18]:

$$GFR \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = 170 \times (\text{Scr})^{-0,999} \times (\text{Alter})^{-0,176} \times (\text{BUN})^{-0,170} \times (\text{Alb})^{+0,318} (\times 0,742 \text{ bei Frauen})$$

GFR: glomeruläre Filtrationsrate in ml/min/1,73m²; *Scr*: Serumkreatinin; *Alter*: in Jahren; *BUN*: Harnstoff-Stickstoff in mg/dl (x 2,14 = Harnstoff); *Alb*: Serum-Albumin in g/dl

Die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz an Hand der GFR ist unter Punkt **2.2.1** dargestellt. Neben dieser im klinischen Alltag üblichen Einteilung hat die Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012 eine neue Klassifikation nach Ursache (**Causa**), GFR und Albuminurie, abgekürzt **CGA**-Klassifikation, vorgenommen [8].

Tabelle 2: CGA-Klassifikation nach Ursache (Causa), GFR und Albuminurie (modifiziert nach [8])

				Albuminurie Kategorien		
				A1	A2	A3
				normal bis mild erhöht	moderat erhöht	stark erhöht
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR Kategorien (ml/min/1,73m ²)	G1	normal oder hoch	≥90			
	G2	milder Abfall	60-89			
	G3a	mild bis moderat	45-59			
	G3b	moderat bis stark	30-44			
	G4	starker Abfall	15-29			
	G5	Nierenversagen	<15			

Die GFR und die Albuminurie korrelieren nicht miteinander und stellen unabhängige Prädiktoren für den Verlauf der Krankheit dar. Das betrifft vor allem die Prognose der chronischen Niereninsuffizienz sowie des akuten Nierenversagens, die kardiovaskuläre Sterblichkeitsrate und die Gesamtmortalität [19-22]. Daher ist die CGA-Klassifikation spezifischer, da sie die Albuminurie in ihrer Stadieneinteilung mitberücksichtigt.

2.2.6. Therapie

Die Therapie der chronischen Niereninsuffizienz richtet sich nach dem Stadium der Einschränkung und der zugrunde liegenden Erkrankung. Zu Beginn wird, wie bei allen chronischen Erkrankungen, versucht frühzeitig alle Komplikationen zu verringern bzw. zu therapieren und die Funktion der Niere möglichst lange aufrechtzuerhalten. Diese Form der Behandlung wird auch als konservative Therapie bezeichnet. Darunter versteht man, die Grunderkrankung frühzeitig zu behandeln, die Nieren vor toxischen Substanzen wie bestimmten Medikamenten und Röntgenkontrastmittel zu schützen, den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt zu kontrollieren sowie die Proteinzufuhr zu begrenzen und die Flüssigkeitszufuhr zu überwachen. Häufig werden Schleifendiuretika zur Steigerung der Diurese eingesetzt [4]. Des Weiteren soll der Blutdruck der Patienten auf niedrig-normale Werte eingestellt und überwacht werden, da kardiovaskuläre Erkrankungen mit über 50 % die häufigsten Todesursachen unter Dialysepatienten darstellen [23]. Ebenfalls muss der Verlust der endokrinen Funktion der Niere begleitend behandelt werden. Darunter zählt z.B. die Gabe von Erythropoetin bei renaler Anämie sowie die Behandlung der renalen Osteopathie, z.B. durch Vitamin D [4].

Die zweite Säule zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz stellt die Nierenersatztherapie dar. Darunter werden die unterschiedlichen Dialyseverfahren sowie die Nierentransplantation zusammengefasst. Beide Behandlungen werden erst in fortgeschrittenen Stadien (4-5) durchgeführt. Im Jahr 2013 wurden ca. 82.000 Patienten in Deutschland dialysiert [13] und 2.323 transplantiert [24].

2.3. Dialyseverfahren

2.3.1. Allgemein

Die Dialyse stellt ein Verfahren zur Reinigung des Blutes dar und wird bei chronischem und akutem Nierenversagen angewendet. Heutzutage gibt es verschiedene Arten von Dialyseverfahren. Sie werden in extrakorporale (außerhalb des Körpers stattfindende) und intrakorporale (innerhalb des Körpers stattfindende) Verfahren eingeteilt. Zu den extrakorporalen Verfahren gehören z.B. die Hämodialyse, die Hämofiltration und die Hämodiafiltration. Ein Beispiel für ein intrakorporales Verfahren ist die Peritonealdialyse [5]

Die Indikationen für den Beginn der Dialyse sind vielfältig und hängen zunächst davon ab, ob das Nierenversagen akut oder chronisch auftritt. Beim akuten Nierenversagen stellen z.B. die Hyperkaliämie, Azotämie, Azidose, Hyperhydratation, Hyperurikämie ($> 12 \text{ mg/dl}$), Anurie > 12 Stunden nach konservativer Therapie sowie ein Serumkreatininanstieg $> 1 \text{ mg/dl}$ in 24 Stunden eine Indikation zur Dialysebehandlung dar [4].

Bei der chronischen Niereninsuffizienz sollen ab dem Stadium 4 ($\text{GFR} < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) mit dem Patienten die verschiedenen Dialysebehandlungen besprochen, vorbereitet und geplant werden [25]. Über den exakten Zeitpunkt zum Start der Dialyse herrscht derzeit Uneinigkeit. Die Leitlinie von 2002 empfiehlt den Beginn der Dialyse, wenn die GFR unter $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ liegt und wenigstens eines der nachfolgend genannten Anzeichen auftreten: Symptome oder Zeichen der Urämie, ein nicht kontrollierbarer Hydratationszustand sowie Bluthochdruck oder ein fortschreitender schlechter Ernährungszustand [26].

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die aktuell am häufigsten verwendeten Dialyseverfahren gegeben.

2.3.2. Hämodialyse

Die Hämodialyse ist mit 87,5 % das in Deutschland am häufigsten eingesetzte Dialyseverfahren [12]. Es beruht auf dem Prinzip der Diffusion. Dabei kommt es aufgrund eines Konzentrationsunterschiedes zweier Flüssigkeiten zu einem Stoffaustausch durch eine semipermeable Membran. Die Poren der Membran sind so groß, dass kleine und mittelgroße Moleküle (bis zu eine Molekülmasse (MW) von 25 000 Da) übertreten können und größere Moleküle wie Blutzellen und Plasmaproteine zurück gehalten werden [27].

Zur Dialysebehandlung wird dem Patienten Blut über einen stabilen Zugang entzogen und mittels Pumpen zum Dialysator geleitet. Dieser stellt mit den semipermeablen Membranen das

Herzstück des Dialysegerätes dar [28]. Das Patientenblut umspült im Dialysator die eine Seite der Membran. Auf der anderen fließt eine isotonische Dialyselösung in entgegengesetzter Richtung (Gegenstromprinzip). Aufgrund der unterschiedlichen Substanzkonzentrationen der beiden Flüssigkeiten kommt es zur Diffusion durch die semipermeable Membran und somit zur Reinigung des Blutes von harnpflichtigen und toxischen Substanzen. Das Maß der Entfernung von Substanzen ist von der Porengröße, der Dicke und Oberfläche der Membran, dem Blut- und Dialysatfluss, der Dauer der Behandlung sowie der Moleküleigenschaft der zu reinigenden Substanzen abhängig [5]. Danach wird das Blut über ein Schlauchsystem dem Patienten wieder zugeführt. Während der Dialyse muss der Patient antikoaguliert werden. Dazu kann Heparin oder Citrat verwendet werden [29].

2.3.3. Hämofiltration

Die Hämofiltration stellt ein alternatives Dialyseverfahren dar, das auf dem Prinzip der Ultrafiltration beruht. Das Patientenblut wird zunächst zur Membran geleitet und umspült diese. Bei der Ultrafiltration findet jedoch keine Diffusion statt, sondern das Ultrafiltrat wird aufgrund eines anliegenden Druckgradienten an der Membran aus dem Blut abgepresst. Dieser Vorgang ähnelt dem Filtrationsvorgang der Glomeruli in der Niere. Das abgepresste Ultrafiltrat enthält aufgrund des transmembranen Flusses neben Wasser und Elektrolyten auch filtergängige, harnpflichtige Substanzen. Im Anschluss wird die eliminierte Flüssigkeit dem Patienten durch eine Elektrolytlösung wieder zugesetzt [27]. Mit der Hämofiltration besteht die Möglichkeit, dem Patienten in kurzer Zeit eine größere Menge Volumen zu entziehen. Der Nachteil liegt jedoch, aufgrund der fehlenden Diffusion, in der geringeren Entfernung von kleinen wasserlöslichen Substanzen aus dem Patientenblut [30]. Daher wird die Hämofiltration in Deutschland mit 0,4 % aller Nierenersatzverfahren nur sehr selten eingesetzt [12].

2.3.4. Hämodiafiltration

Die Hämodiafiltration vereinigt die beiden Prinzipien der Hämodialyse und der Hämofiltration miteinander. Im Jahr 2006 wurden 7,3 % der Dialysepatienten in Deutschland mit diesem Verfahren behandelt [12]. Der Vorteil der Hämodiafiltration besteht darin, dass aufgrund der Kombination von Diffusion und Ultrafiltration sowohl niedermolekulare Stoffe als auch mittelmolekulare Substanzen in ausreichendem Maße aus dem Blut eliminiert werden [27, 30].

Ob es dadurch zu einer Reduktion der Morbidität und Mortalität der Dialysepatienten kommt, ist derzeit jedoch noch unklar [31].

2.3.5. Peritonealdialyse

Die Peritonealdialyse ist eine intrakorporale Methodik. Sie beruht wie die Hämodialyse auf dem Prinzip der Diffusion über eine semipermeable Membran. Der wesentliche Unterschied zur Hämodialyse besteht darin, dass das Bauchfell (lat. Peritoneum) diese Membran darstellt. Das Peritoneum ist eine seröse Haut, die gut durchblutet ist und die Bauchhöhle auskleidet [32].

Bei der Peritonealdialyse wird die Spülflüssigkeit über einen Katheter in die Bauchhöhle geleitet und umgibt das Peritoneum. Das Kapillarendothel ist die natürliche Barriere des Peritoneums und stellt somit die Membran für die Dialyse dar. Aufgrund des Konzentrationsunterschieds zwischen dem Blut und der Spüllösung kommt es zur Diffusion von den gelösten, ausscheidungspflichtigen Substanzen aus dem Blut durch das Peritoneum in die Spüllösung. Diese wird am Ende der Dialyse durch einen Katheter aus der Bauchhöhle abgelassen. Die Diffusionsrate hängt vor allem von der Durchblutung des Peritoneums und der Konzentrationsdifferenz ab [32].

Vorteile der Peritonealdialyse sind die Schonung des Kreislaufes, der längere Erhalt der Restfunktion der Niere [33] und die Möglichkeit der häuslichen Durchführung. Die große Gefahr besteht allerdings in der Entwicklung einer Peritonitis. Hierunter wird eine Entzündung des Bauchfells verstanden, welche als ascendierende Infektion über den Dialysekatheter entstehen kann [27].

Alle Dialyseverfahren haben die Aufgabe, die ausgefallene exkretorische Funktion der Niere zu kompensieren. Sie sind in der Lage, den Tod durch die Entstehung der Urämie, die beim akuten und auch chronischen Nierenversagen auftritt, zu verhindern bzw. hinaus zu zögern. Jedoch können nicht alle toxischen Substanzen aus dem Blut entfernt werden. Vor allem die proteingebundenen und großmolekularen Substanzen verbleiben oft im Patientenblut oder werden nur in unzureichendem Maße entfernt [34].

2.4. Urämietoxine

Die Urämietoxine stellen eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen dar, die erst in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen haben [35]. Mit dem Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz und der Abnahme der glomerulären Filtrationsrate sammeln sich Substanzen im Körper an, die normalerweise von der Niere ausgeschieden oder metabolisiert werden [36, 37]. Weisen diese Substanzen eine biologische Aktivität auf, werden sie laut Vanholder als Urämietoxine bezeichnet [38]. Diese wurden 2003 von der European Uremic Toxin Work Group (EUTox) nach physikalisch-chemischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt [38]:

- 1.) kleine wasserlösliche Urämietoxine mit einem MW < 500 Da
- 2.) Mittelmoleküle mit einem MW > 500 Da
- 3.) proteingebundene Urämietoxine (siehe **Tabelle 3**)

Tabelle 3: Klassifikation der Urämietoxine (modifiziert nach [38])

Klassifikation	Charakteristika	Beispiele	Toxisches Potential
kleine, hydrophile Moleküle	MW < 500 Da, effektiv durch Dialyse entfernbar	Harnstoff, Kreatinin	geringer toxischer Effekt
Mittelmoleküle	MW > 500 Da, nur durch Membranen mit großen Poren entfernbar	B ₂ -Mikroglobulin, Leptin	großer toxischer Effekt
proteingebundene Moleküle	Alle MW, geringe Entfernung mit Dialyseverfahren	Phenole, Indole	großer toxischer Effekt

Die 2003 von der EUTox Gruppe beschriebenen Urämietoxine umfassten 90 Substanzen [38], zu denen über die Jahre weitere hinzugekommen sind. Mittlerweile sind 158 Urämietoxine identifiziert worden, von denen 73 als kleine wasserlösliche Substanzen [39], 54 als Mittelmoleküle [39, 40] und 31 als proteingebundene Substanzen [39, 41] klassifiziert wurden.

Die Toxizität der Urämietoxine wurde in zahlreichen Studien belegt und betrifft das gesamte Organsystem [42]. Jedoch sind vor allem ihre negativen Effekte auf das kardiovaskuläre System kausal verantwortlich für die Morbidität und Mortalität in den frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz [43, 44]. Hierfür werden vorrangig die proteingebundenen Urämietoxine [41] und die Mittelmoleküle [40] verantwortlich gemacht. Doch auch in der Gruppe der niedermolekularen wasserlöslichen Substanzen konnte gezeigt werden, dass sich vor allem die

Guanidine, das asymmetrische (ADMA) und das symmetrische Dimethylarginin (SDMA) negativ auf das kardiovaskuläre System auswirken [35].

Die neurotoxischen Effekte der Guanidine sind seit längerem bekannt [45, 46]. In neusten Studien wurden jedoch auch die Aktivierung von Leukozyten und proinflammatorische Effekte nachgewiesen [47, 48]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) inhibiert und dadurch endotheliale Dysfunktionen sowie vaskuläre Schädigungen verursacht [49]. Laut Zoccali et al. korreliert die ADMA-Konzentration bei Dialysepatienten mit der Intima-Mediadicke, die unter anderem einen Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose darstellt [50]. Auch für das symmetrische Dimethylarginin (SDMA) wurde eine Inhibition der NOS [51] sowie Leukozytenaktivierungen durch Entstehung von Sauerstoffradikalen (ROS) demonstriert [52].

In der Gruppe der proteingebundenen Urämietoxine sind vor allem Indoxylsulfat und die Konjugate von p-Kresol, p-Kresylsulfat und p-Kresylglukuronid untersucht worden. Bis vor wenigen Jahren analysierten viele Studien p-Kresol, welches als Hauptverursacher für die Schädigungen vermutet wurde. Es stellte sich jedoch heraus, dass p-Kresol nicht im Körper vorkommt, sondern nur als Artefakt durch die Deproteinierung der Proben entsteht [53-55]. Die Untersuchungen von p-Kresylsulfat zeigten, dass es proinflammatorische Eigenschaften durch die Induktion von freien Radikalen entwickelt [56, 57] und endotheliale Mikroschäden verursacht [58]. Zudem scheint p-Kresylsulfat mit dem Fortschreiten der Niereninsuffizienz [59], dem Auftreten von koronaren Herzerkrankungen [60, 61] und vaskulären Verkalkungen [62] sowie einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert zu sein [62, 63].

Indoxylsulfat, ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der proteingebundenen Urämietoxinen, steht im Verdacht, kardiovaskuläre Schäden durch z.B. die Aktivierung von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) durch Induktion von NF- κ B und dadurch die Freisetzung von freien Radikalen [64] zu verursachen. Des Weiteren führt es zu endothelialen Dysfunktionen [65] und induziert die Proliferation von glatten Muskelzellen [66]. Es verursacht eine glomeruläre Sklerose [67, 68] wodurch es zu einer tubulointerstitiellen Fibrose kommen kann und somit zum Fortschreiten der Niereninsuffizienz. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Indoxylsulfat eine signifikante Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt und einen direkten Einfluss auf die Mortalität der chronisch niereninsuffizienten Patienten hat [69].

Derzeit sind über 50 Mittelmoleküle beschrieben unter denen eine Reihe von Substanzen in Verbindung mit kardiovaskulären Schäden, proinflammatorischen Prozessen, endothelialen Dysfunktionen und glatten Muskelzell-Proliferation stehen [35]. Der bekannteste Marker ist

Beta₂-Mikroglobulin. In der 2. Auswertung der HEMO Studie konnte gezeigt werden, dass bei Hämodialysepatienten der Beta₂-Mikroglobulin Serumspiegel mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist [70]. Ebenfalls wurden erhöhte Beta₂-Mikroglobulinspiegel bei nicht dialysepflichtigen, chronisch niereninsuffizienten Patienten beschrieben sowie eine Assoziation zu vermehrten kardiovaskulären Ereignissen und einer erhöhten kardiologischen Mortalität festgestellt [71]. Des Weiteren stellt ein erhöhter Beta₂-Mikroglobulin Serumspiegel ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Hämodialyse-assoziierten Amyloidose dar [72].

Bei Dialysepatienten mit einem erhöhten Interleukin-6 Spiegel wurde eine signifikant höhere Mortalität beschrieben [73-75]. Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stellt bei Hämodialysepatienten einen stärkeren Prädiktor in Bezug auf die Mortalität dar, als Interleukin-6 [76]. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF-23) ist ebenfalls ein weiterer Vertreter der Mittelmoleküle und mit dem Fortschreiten des Nierenversagens [77], kardialen Fehlfunktionen [78] und einer erhöhten Mortalität assoziiert [79].

Die genannten Substanzen geben nur einen kleinen Einblick über die Auswirkungen der Urämietoxine bei chronisch niereninsuffizienten Patienten wieder. Durch ihre unzureichende Elimination mit den konventionellen Dialyseverfahren [34] kommt es zu Anreicherungen der Substanzen im Körper und zur Entwicklung ihres toxischen Potentials, was die Morbidität und Mortalität der Patienten erhöht [59, 80-82].

Mittelmoleküle können vermehrt durch den Einsatz von Dialysemembranen mit größeren Poren (High-Flux) entfernt werden [83]. Durch die zusätzliche Verwendung der Ultrafiltration, z.B. mittels Hämodiafiltration, wird dieser Effekt noch weiter gesteigert [84-86]. Des Weiteren erwiesen sich eine verlängerte Dialysezeit sowie verkürzte Intervalle zwischen den Dialysetagen als positiv für die Entfernung der Mittelmoleküle aus dem Blut [87].

Die proteingebundenen Urämietoxine zeigten im Gegensatz zu den Mittelmolekülen keine vermehrte Eliminierung durch Verwendung von High-Flux-Dialysatoren im Vergleich zu Low-Flux-Dialysatoren [88]. Durch die Kombination von Ultrafiltration und Diffusion in Form der Hämodiafiltration konnte die Konzentration der proteingebundenen Urämietoxinen verringert werden [84]. Krieter et al. konnte diesen Effekt jedoch nicht bestätigen [89]. Somit erweist sich die Entfernung proteingebundener Toxine aufgrund der chemischen Eigenschaften als schwierig und stellt eine Herausforderung für die konventionelle Dialyse dar [54, 88].

Plasmaproteine diffundieren nicht über die semipermeable Membran und somit werden die an ihnen gebundenen hydrophoben Toxine nicht entfernt [54]. Daher ist die Entwicklung von alternativen Verfahren von größter Bedeutung. Ein möglicher Ansatzpunkt scheint in diesem

Zusammenhang der Einsatz von Adsorbentien darzustellen. Diese wurden ursprünglich zur Entgiftung des Körpers bei akutem Leberversagen entwickelt. Im Zuge der Dissertation wurde das extrakorporale Blutreinigungsverfahren Prometheus[®] von Fresenius für den Einsatz von nierenerkrankten Patienten umgebaut und an fünf chronisch niereninsuffizienten Patienten getestet [90].

2.5. Funktionsweise des Prometheus[®]-Systems

Das Prometheus[®]-System ist ein Verfahren zur extrakorporalen Blutreinigung, das primär zur Unterstützung der Entgiftungsfunktion der Leber entwickelt wurde [91]. Es entfernt albumingebundene und wasserlösliche Toxine in zwei aufeinanderfolgenden Kreisläufen. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus einem Dialyse- und einem Adsorptionsverfahren. Neben dem konventionellen Dialysekreislauf ist das Prometheus[®]-System um ein Modul zur fraktionierten Plasmaseparation und Adsorption, dem FPSA-Kreislauf, erweitert worden. Dieser besteht aus einem albumindurchlässigen Spezialfilter, dem AlbuFlow (AF 1, Fresenius Medical Care), sowie zwei aufeinander folgenden Adsorbentien. (**Abbildung 2**)

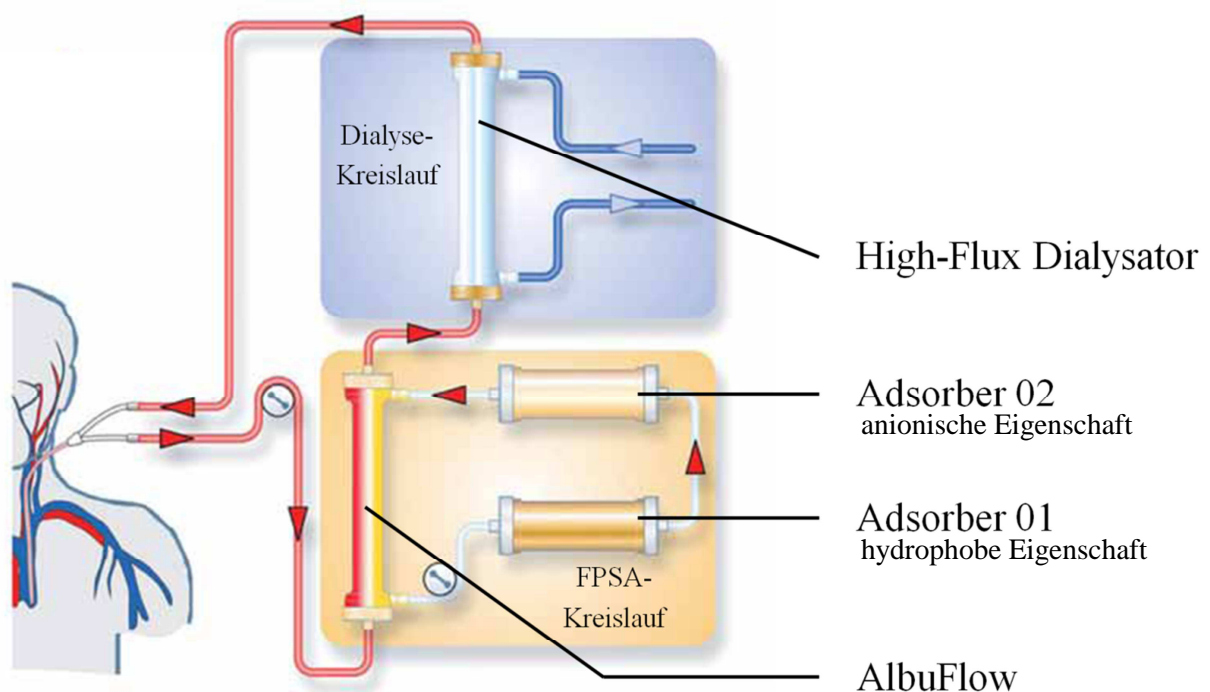


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prometheus[®]-Systems Fresenius Medical Care (modifiziert nach [92])

Zunächst wird das Patientenblut mittels Schlauchpumpe durch einen Doppel-Lumen Katheter in den FPSA-Kreislauf gefördert. Dort passiert es zuerst den AlbuFlow. Dieser besteht aus einem Albumin-permeablem Polysulfonfilter mit einer Membrandurchlässigkeit von ca. 300 kDa. Dadurch kann Albumin aus dem Patientenblut abgefiltert werden (Albumin 68 kDa), während größere Moleküle und Zellen, wie Blutplättchen oder Fibrinogen, im Blut verbleiben. Die auf diese Weise entstandenen albuminreichen Plasmafraktionen werden daraufhin den beiden Adsorbern zugeführt. Diese bestehen aus einem Styrol-Divinylbenzen Copolymer. Der Adsorber 1 ist ein Neutralharzadsorber (Fresenius Medical Care), an dem vor allem hydrophobe Substanzen binden. Bei dem Adsorber 2 handelt es sich um einen Anionenaustauscher (Fresenius Medical Care), an dem anionische Substanzen retendieren. Die am Albumin gebundenen Toxine weisen eine sehr hohe Affinität zum Adsorbermaterial auf, sodass durch Adsorption das Albumin von den Toxinen getrennt wird. Anschließend wird das Albumin dem Albufilter zugeführt und gelangt gereinigt wieder in den Blutkreislauf. Die wasserlöslichen Toxine werden schließlich durch einen Dialysekreislauf mit einem konventionellen High-Flux-Dialysator (FX 800, Fresenius Medical Care) entfernt. Beide Kreisläufe werden von einer eigenständigen Hard- und Software überwacht [92].

2.5.1. Evaluierung der Abtrennleistung des Prometheus[®]-Systems

Zur Evaluierung und Etablierung eines adsorptiven Verfahrens bei niereninsuffizienten Patienten wurde eine Pilotstudie mit dem Prometheus[®]-System durchgeführt [90]. Hierzu wurden fünf chronisch niereninsuffiziente Patienten (CKD-Patienten) im Stadium 5D einmalig mit dem Prometheus[®]-System dialysiert und die Konzentration drei repräsentativer Urämietoxine (Phenyllessigsäure, Indoxylsulfat und p-Kresylsulfat) bestimmt. Als Kontrollgruppe fungierten ebenfalls fünf CKD-Patienten im Stadium 5D, die mittels einer konventionellen Hämodialyse mit einem High-Flux-Dialysator behandelt wurden. Beide Gruppen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen nachbehandelt, in dessen Verlauf klinisch relevante Parameter untersucht und kontrolliert wurden.

Während der einmaligen Behandlung mit dem Prometheus[®]-System wurden Blutproben vor, während und nach der Behandlung gesammelt, analysiert und mit der Kontrollgruppe verglichen. In der Studie konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit dem Prometheus[®]-System die Plasmakonzentration von Phenyllessigsäure um den Faktor 6,2, von Indoxylsulfat um den Faktor 4,6 und von p-Kresylsulfat um den Faktor 3,4 reduziert wurde. Im Vergleich dazu wurde die Plasmakonzentration in der Vergleichsgruppe mit der konventionellen Hämodialyse von

Phenyllessigsäure nur um den Faktor 2,7, Indoxylsulfat um den Faktor 1,6 und p-Kresylsulfat um den Faktor 1,5 reduziert. Somit entfernt die Behandlung mit dem Prometheus[®]-System Phenyllessigsäure um 130 %, Indoxylsulfat um 187 % und p-Kresylsulfat um 127 % effektiver, als das konventionelle Hämodialyseverfahren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass vor allem der FPSA-Kreislauf des Prometheus[®]-Systems den größten Einfluss auf die Abtrennrates der drei proteingebundenen Urämietoxine hat.

Nach der Behandlung mit dem Prometheus[®]-System kam es zu einem Anstieg der Urämietoxine, wobei das Ausgangsniveau in beiden Gruppen nach drei Tagen wieder erreicht wurde.

In der Pilotstudie konnte demnach gezeigt werden, dass bei stabilen klinischen Parametern mittels Einsatz des Prometheus[®]-Systems im Vergleich zu einer konventionellen Hämodialyse die Konzentration von drei klinisch relevanten proteingebundenen Urämietoxinen signifikant stärker gesenkt werden konnte. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage zur weiteren Evaluierung und Etablierung von adsorptiven Verfahren als Therapieoption bei chronisch niereninsuffizienten Patienten.

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Der Einsatz von Dialyseverfahren zur Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz ist heutzutage ein gängiges Verfahren. In Deutschland wird am häufigsten mit ca. 87,5 % die Hämodialyse durchgeführt [12]. Bei der Verwendung dieser Dialyseform werden jedoch proteingebundene Urämietoxine und Mittelmoleküle nur in unzureichendem Maße aus dem Patientenblut entfernt [34] und können somit ihr toxisches Potential entfalten. Aufgrund dessen ist es unerlässlich, neue Dialyseformen mit besserer Abtrennleistung zu entwickeln. Der Einsatz von adsorptiven Verfahren scheint hier eine neue Möglichkeit darzustellen. Im Rahmen der Dissertation wurde ein adsorptives Verfahren von Fresenius (das Prometheus[®]-System) für die Dialysebehandlung modifiziert und an fünf chronisch niereninsuffizienten Patienten einmalig getestet.

Ziel der Dissertation ist die an dem Adsorbermaterial retentierten Substanzen mittels chromatographischer Verfahren zu isolieren und die molekulare Strukturen der betreffenden Substanzen massenspektrometrisch zu identifizieren. Auf diese Weise soll das adsorptive Potential des Adsorberverfahrens eingeschätzt werden.

2.7. Methoden

2.7.1. Grundlagen der Chromatographie

Die Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Verfahren zur Auftrennung von Substanzgemischen, bei der es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Analyten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase kommt. Die zu untersuchenden Analyten werden in der mobilen Phase gelöst und über die stationäre Phase geleitet. Dabei kann die mobile Phase aus einer Flüssigkeit oder einem Gas bestehen. Gemäß diesem Aggregatzustand unterscheidet man zwischen der Flüssigkeits- und der Gaschromatographie [93]. Die stationäre Phase besteht aus einem festen Trägermaterial, an dem funktionelle Gruppen gebunden sind. Zwischen dem Trägermaterial der stationären Phase und den in der mobilen Phase gelösten Analyten kommt es zu Wechselwirkungen in Form von Adsorption, Ionenaustausch und Komplexbildung [94]. Die dadurch entstehende unterschiedliche Verteilung der gelösten Stoffe zwischen der mobilen und stationären Phase führt zur Auftrennung des Analytengemisches. Diese kann durch den Einsatz von unterschiedlichen Trägermaterialien der stationären Phase, der Verwendung verschiedener Lösungsmittel als mobile Phase und Temperaturänderung beeinflusst werden [93].

2.7.2. Anwendungsgebiete der Chromatographie

Die Chromatographie ist ein sehr vielfältig einzusetzendes Analyseverfahren. Sie wird beispielsweise zur Reinigung und Isolierung von Syntheseprodukten in der Produktion genutzt. Des Weiteren kommt sie in der chemischen Analytik zur Auftrennung von Substanzgemischen sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen zum Einsatz. In der medizinischen Forschung wird die Chromatographie zur Fraktionierung, Isolierung und Quantifizierung von Biomolekülen verwendet [95].

2.7.3. Aufbau einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) ist eine der wichtigsten Methoden der Flüssigkeitschromatographie, die sich durch eine schnelle und hohe Trennleistung auszeichnet [93]. Die fünf Hauptkomponenten einer HPLC-Anlage sind die Pumpe, das Einspritzsystem, die Trennsäule, der Detektor und das Auswertesystem. (**Abbildung 3**)

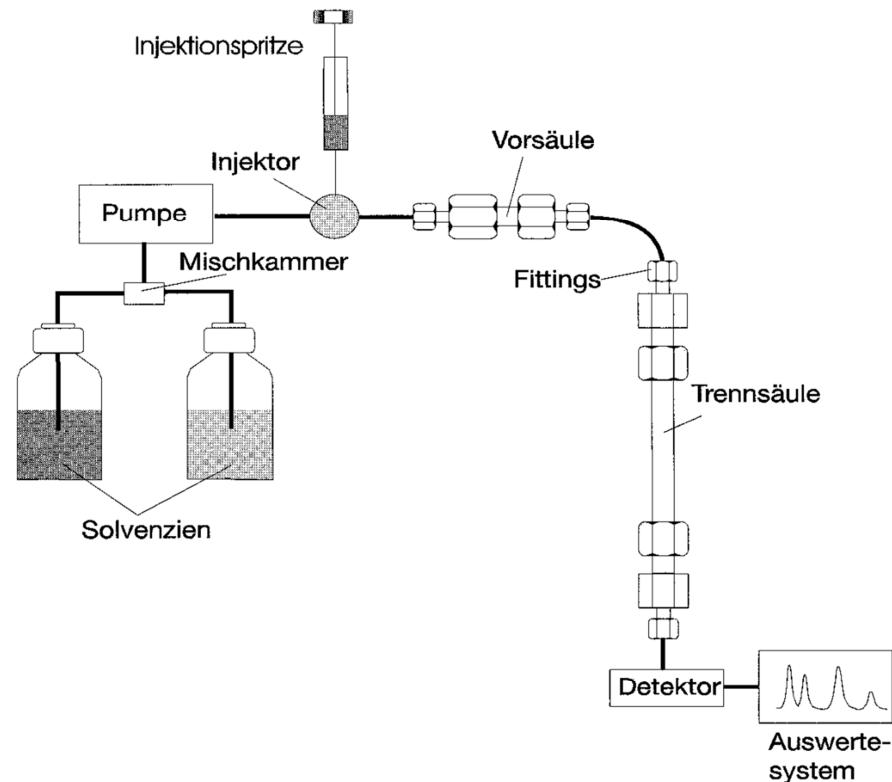


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage (aus [94])

Die Pumpe erzeugt einen konstanten Druck, mit der das Laufmittel auf die Trennsäule aufgetragen wird. Hierbei können zwei Arten der Elution des Analyten unterschieden werden. Bei der isokratischen Elution wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während des gesamten Elutionsvorgangs nicht verändert. Daher bleiben die Wechselwirkungen zwischen der mobilen und stationären Phase über den gesamten Zeitraum des Trennvorganges konstant. Sie zählt zu den einfachen Methoden mit einer geringeren Auflösung. Zur Elution von komplexen Substanzgemischen bietet sich die Gradientenelution an. Dabei wird die Zusammensetzung der mobilen Phase entweder schrittweise (Stufengradient) oder kontinuierlich (Lineargradient) verändert. Zu Beginn wird ein weniger starkes Elutionsmittel verwendet, das während der Gradientenelution durch ein stärker eluierendes Lösungsmittel ersetzt wird. Dadurch steigt die Elutionskraft der mobilen Phase an und selbst stark retendierte Substanzen werden innerhalb einer akzeptablen Analysezeit eluiert. Durch die Veränderung des Gleichgewichtes des Lösungsmittels muss vor jeder weiteren Auftrennung die Trennsäule wieder auf ihr ursprüngliches Lösungsmittelgleichgewicht eingestellt werden. Diesen Prozess nennt man Äquilibrierung [94].

Nach der Äquilibrierung wird über das Einspritzsystem die Probe ohne Druckabfall in die HPLC-Anlage eingebracht und mittels elektrischer Pumpe auf die Trennsäule aufgetragen. Dabei

schützt eine Vorsäule die Trennsäule vor Verunreinigungen. Die Trennsäule besteht aus einem Edelstahl- oder Kunststoffrohr, das mit einem Trägermaterial gefüllt ist. Durch Verwendung verschiedener Trägermaterialien kann die Oberfläche der stationären Phase modifiziert und auf diese Weise können unterschiedliche Trennleistungen erreicht werden.

Ein weiterer Bestandteil einer HPLC-Anlage ist der Detektor. Hier kommt neben zahlreichen anderen Detektoren wie beispielsweise der Fluoreszenzdetektor, der elektrochemische Detektor, der massensensitive Detektor oder der Leitfähigkeitsdetektor, am häufigsten jedoch der UV-Vis-Detektor zum Einsatz. Dieser hat eine Lichtquelle, die im UV-Bereich (100-400 nm) und sichtbaren Bereich (400-800 nm) emittiert. Dabei wird Licht einer definierten Wellenlänge durch eine Photozelle geleitet und am Detektor registriert. Werden Analytenmoleküle durch die Photozelle geführt, absorbieren sie einen Teil des einstrahlenden Lichtes, sodass ein geringerer Teil am Detektor gemessen wird. Die Extinktion (E) hängt gemäß dem Lambert-Beersche Gesetz: $E = \varepsilon(\lambda) \times c \times d$ direkt vom Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon(\lambda)$), von der Schichtdicke (d) und der Konzentration (c) des jeweiligen Analyten ab [94].

Zusätzlich werden Leitfähigkeitsdetektoren verwendet, welche die elektrische Leitfähigkeit der durchfließenden Lösungen messen. Der Detektor ist aus Messzellen aufgebaut. Diese bestehen aus zwei sich gegenüberliegenden Elektroden, die von der zu messenden Elektrolytlösung umspült werden. Durch die Anlage von Wechselspannung an die beiden Elektroden fließt ein Strom, der vom spezifischen Widerstand der Elektrolyte und der Dimensionierung der Zellen abhängig ist [95].

2.7.4. Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie, auch Reversed Phase Chromatographie, genannt zählt zu den Flüssigkeitschromatographien und wird mit einer Häufigkeit von 70 % in der HPLC verwendet [95]. Sie beruht auf hydrophoben, unpolaren Wechselwirkungen des Analyten mit der unpolaren, hydrophoben, stationären Phase und der polaren, mobilen Phase. Die Umkehrung der Phaseneigenschaften im Vergleich zur Normalphasenchromatographie ist namensgebend für die Umkehrphasenchromatographie [93].

Die stationäre Phase besteht meistens aus modifizierten Kieselgelen, an denen unpolare, hydrophobe Alkylketten gebunden sind. Dadurch binden unpolare, hydrophobe Substanzen an der stationären Phase, während polare, hydrophile Substanzen mit der polaren, mobilen Phase von der Säule eluiert werden. Hierbei gilt, je hydrophober eine Substanz ist, desto länger verweilt sie auf dem Trägermaterial und führt auf diese Weise zur Auftrennung von komplexen

Analytengemischen. Typische Lösungsmittel der mobilen Phase sind Wasser, Methanol sowie Azetonitril [96].

Ionisch geladene Analyten können durch die Zugabe von gegensätzlich geladenen Ionen eine nach außen hin neutral geladene Ionenpaarreagenz bilden und dadurch auch in Wechselwirkung mit der unpolaren, stationären Phase treten. Als Ionenpaarreagenzien kommen beispielsweise Triethylammoniumacetat (TEAA) und Trifluoressigsäure (TFA) zum Einsatz [93].

Reversed Phase Chromatographien sind vor allem zur Auftrennung von hydrophoben Analyten geeignet. Sie zeichnen sich durch eine hohe Trennleistung und Reproduzierbarkeit aus [95].

2.7.5. Ionenchromatographie

Die Ionenchromatographie ist ein wichtiges Verfahren zur Auftrennung von geladenen Substanzgemischen. Die dabei verwendeten Ionenaustauscherharze bestehen aus funktionellen Gruppen mit fixierter Ladung, an denen es zu kompetitiven Wechselwirkungen der geladenen Analyten kommt. Es wird dabei zwischen Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie unterschieden [97].

2.7.6. Anionenaustausch-Chromatographie

Die stationäre Phase der Anionenaustausch-Chromatographie trägt kovalent gebundene kationische Gruppen. An diese positiv geladene stationäre Phase werden anionische Substanzen retendiert.

Die Ionenaustauschchromatographie wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten verdrängen die anionischen Probensubstanzen zuvor gebundene mobile Ionen aus dem Laufpuffer und binden an der stationären Phase. Im zweiten Schritt werden die gebundenen Probensubstanzen durch die Ionen der mobilen Phase, welche eine höhere Konzentration aufweisen, verdrängt und eluiert. Dabei gilt, je stärker negativ geladen die Probensubstanzen sind, desto stärker binden sie an dem Säulenmaterial. Der pH-Wert des Puffers spielt hierbei eine wichtige Rolle, da er die Nettoladung der Substanzen bedingt und somit indirekt Einfluss auf ihre Bindung an die stationäre Phase hat. Als Lösungsmittel zur Elution wird typischerweise ein Salzgradient mit Natriumchlorid (NaCl) eingesetzt [97].

2.7.7. Kationenaustausch-Chromatographie

Das Prinzip der Kationenaustausch-Chromatographie ist äquivalent zu dem unter **2.7.6** beschriebenen Auftrennungsprinzip. Der Unterschied besteht aus einer Umkehrung der Ladungsverhältnisse der stationären und mobilen Phase. Dementsprechend treten vor allem kationische Probensubstanzen mit einer anionisch geladenen stationären Phase in Wechselwirkung und werden durch ein stärkeres kationisch geladenes Lösungsmittel verdrängt. Folglich eluieren stark kationische Substanzen mit einer hohen Affinität zur stationären Phase erst spät von der Säule [97].

2.7.8. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie stellt ein Verfahren zur Bestimmung der Masse von Atomen oder Molekülen dar. Dazu werden die zu untersuchenden Substanzen zunächst ionisiert und durch elektrische und/oder magnetische Felder beschleunigt. Die dadurch entstehenden Geschwindigkeiten bzw. erzwungenen Kreisbahnradien sind von der Massenträgheit der zu analysierenden Teilchen abhängig und können aufgrund dessen nach ihren Massen selektiert werden [98].

Es gibt verschiedene Modelle von Massenspektrometern, die sich vor allem in der Art der Ionisierungsmethoden unterscheiden [98]. Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (electrospray ionization, ESI) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) zählen dabei zu den schonenden Ionisierungstechniken. Bei diesen Verfahren kommt es kaum zu einer spontanen Fragmentierung der Analyten. Sie werden daher vor allem zur Analyse von Biomolekülen eingesetzt [99, 100]

2.7.9. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Bei der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) liegen die Analytmoleküle in gelöster Form vor und werden mit einem Lösungsmittel durch eine Metallkapillare geleitet. An der Kapillarspitze liegt eine elektrische Spannung von 1-5 kV an und induziert ein elektrisches Feld. Dieses bildet sich zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode. (**Abbildung 4**)

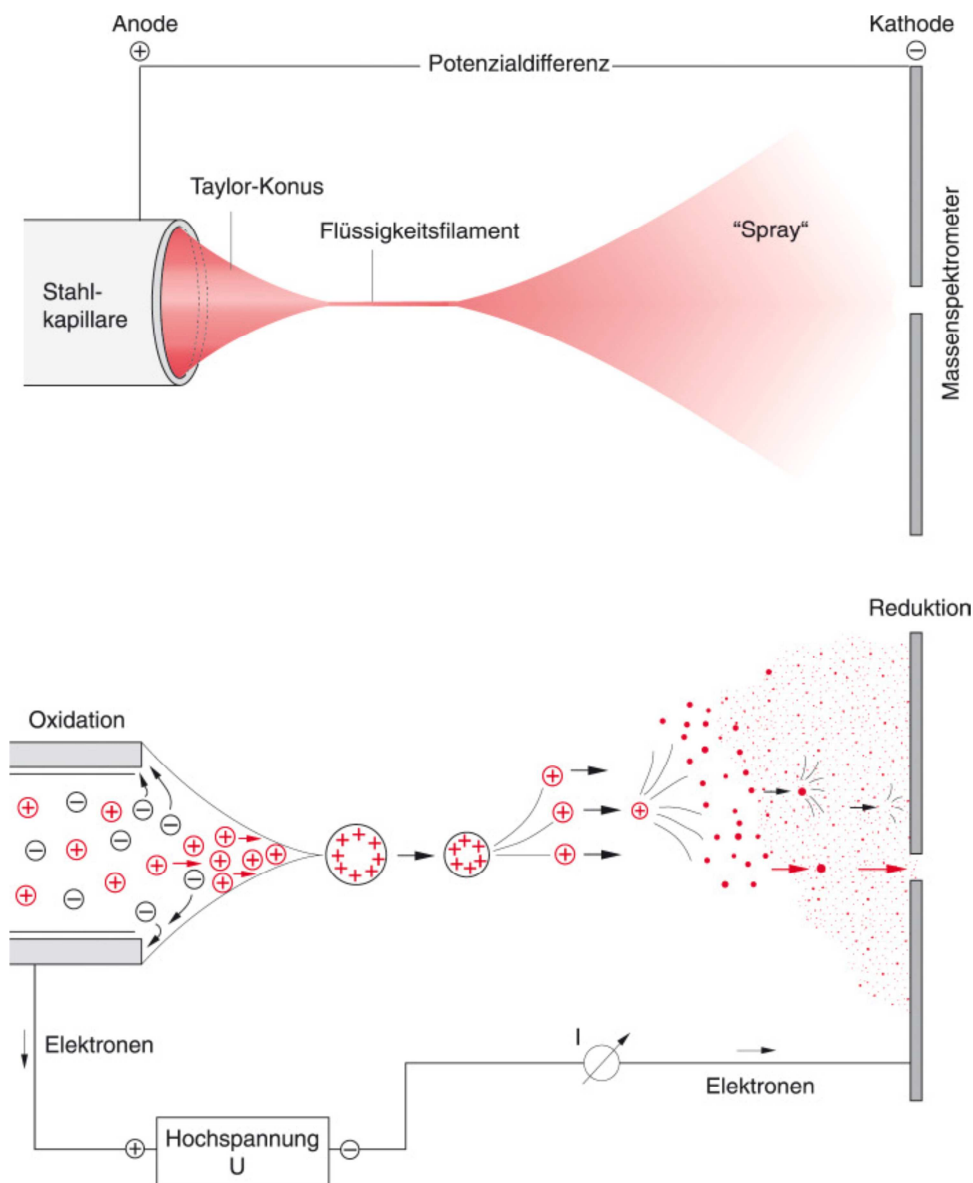


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers (aus [93])

Beim Austritt der Analytmoleküle aus der Kapillare in das elektrische Feld kommt es zur Ausbildung des sogenannten Taylor-Konus. Dieser besteht aus einem Überschuss an gleichartig geladenen Ionen, die sich gegenseitig abstoßen. Dadurch kommt es zur Tropfenbildung des Lösungsmittels und schließlich zur Entstehung eines feinen Nebels. Die Vernebelung der Lösung

und die Verdampfung des Lösungsmittels kann durch den Einsatz von Stickstoff, als Trocknungsgas, und durch die Erhöhung der Konustemperatur unterstützt werden. Dies führt zur Desolvatisierung des Analyten. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich der Tröpfchenradius, während die Dichte der geladenen Teilchen zunimmt. Die dadurch hervorgerufenen Coulomb-Explosionen, die durch die Abstoßung gleich geladener Teilchen entstehen, führen zum Zerfall der Tröpfchen und zur Bildung von mehrfach geladenen Gasionen. Diese können durch die Aufnahme eines Protons $[M-H]^+$ aus dem Lösungsmittel positive oder durch den Verlust eines Protons $[M-H]^-$ negative Ladungen annehmen. Dabei bedingt die Spannung an der Kapillare die Ladung der Ionen. Anschließend erfolgt die Umlenkung und Detektion des Analyten [93].

Mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie besteht die Möglichkeit, hochauflösende Fragmentspektren aufzunehmen. Dabei werden die zu analysierenden Ionen in der Ionenfalle fragmentiert. Zunächst wird das relevante Ion isoliert und durch eine Kombination von hochfrequenten elektrischen Feldern und einem Gleichstrom zur Oszillation gebracht. In der unter Hochvakuum stehenden Kollisionskammer kommt es zur Kollision der zu analysierenden Substanz mit einem Kollisionsgas und dies führt zu deren Fragmentierung. Die entstandenen Fragmente werden daraufhin aus der Ionenfalle geleitet und detektiert. Es besteht aber auch die Möglichkeit, das Fragment in der Ionenfalle wiederholt zu fragmentieren. Die daraus resultierenden MS^n -Fragmentspektren (n = Ordnung des Fragmentspektrums) sind sehr hoch auflösend und komplex, wodurch die Identifizierung von molekularen Strukturen gewährleistet werden kann.

Ein weiterer Vorteil der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie ist die Kopplung mit einem HPLC-System (LC-ESI-MS). Dadurch können vor der massenspektrometrischen Messung einerseits Salzurückstände und Verunreinigungen aus der Probe entfernt und andererseits die Probe zu einem scharfen Peak aufkonzentriert werden [93].

3. Methodik

3.1. Durchführung der Behandlung mit dem Prometheus[®]-System

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité, Berlin (EA 4/057/10), genehmigt. In der Studie wurden Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 5D, welche seit mindestens zwei Monaten mit einer konventionellen High-Flux Hämodialyse (High-Flux HD) behandelt wurden, eingeschlossen. Die Art des Behandlungsverfahrens wurde randomisiert, alle teilnehmenden Patienten wurden aufgeklärt und haben vor Beginn der Studie die Einwilligungserklärung unterzeichnet.

In der von uns durchgeführten Studie wurden fünf chronisch niereninsuffiziente Patienten im Stadium 5D einmalig mit dem Prometheus[®]-System (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) über fünf Stunden, statt der konventionellen High-Flux HD, behandelt. Die Behandlung mit dem Prometheus[®]-System fand nach dem „langen Intervall“ der konventionellen Hämodialyse statt. Diese wurde im Anschluss wieder aufgenommen. Der extrakorporale Kreislauf des Prometheus[®]-Systems wurde mit 2 L physiologischer Kochsalzlösung befüllt und zur Antikoagulation mit 5000 IU/L Heparin versetzt. Die Behandlung mit dem Prometheus[®]-System wurde mittels Doppelantikoagulation mit Zitratlösung (0,5 mol/L) und kalziumfreien Dialysekonzentrat (Fresenius Medical Care) durchgeführt. Kalzium wurde im Anschluss an die Dialyse wieder reinfundiert. Der Blutfluss betrug im Durchschnitt 226 ± 3 ml/min und es wurden $68,1 \pm 0,9$ L Blut dialysiert.

Als Kontrollgruppe wurden fünf chronisch niereninsuffiziente Patienten im Stadium 5D mit einer konventionellen High-Flux HD (FX 800, Fresenius Medical Care) über fünf Stunden behandelt. Der extrakorporale Kreislauf wurde mit 1 L 5000 IU Heparin/L Kochsalzlösung befüllt. Der Blutfluss betrug 248 ± 10 ml/min. Im Anschluss an die Behandlung mit dem Prometheus[®]-System wurde die konventionelle Dialyse in beiden Gruppen fortgesetzt.

3.2. Aufreinigung des hydrophoben Adsorbers (Adsorber 1)

3.2.1. Elution der Substanzen von dem Adsorber 1

Nach der Behandlung mit dem Prometheus[®]-System wurden die in dem Verfahren verwendeten Adsorber-Kartuschen dem Gerät entnommen. Zur Elution der retendierten Substanzen wurde der Adsorber 1 mit Hilfe eines Schlauchsystems (Fresenius) und einer Schlauchpumpe (Fresenius) mit 1 L 100 % Ethanol gespült und die Lösung bei -80 °C verwahrt. Das gewonnene Probenvolumen wurde mittels Lyophilisation getrocknet und nach folgendem Schema aufgereinigt. (**Abbildung 5**)

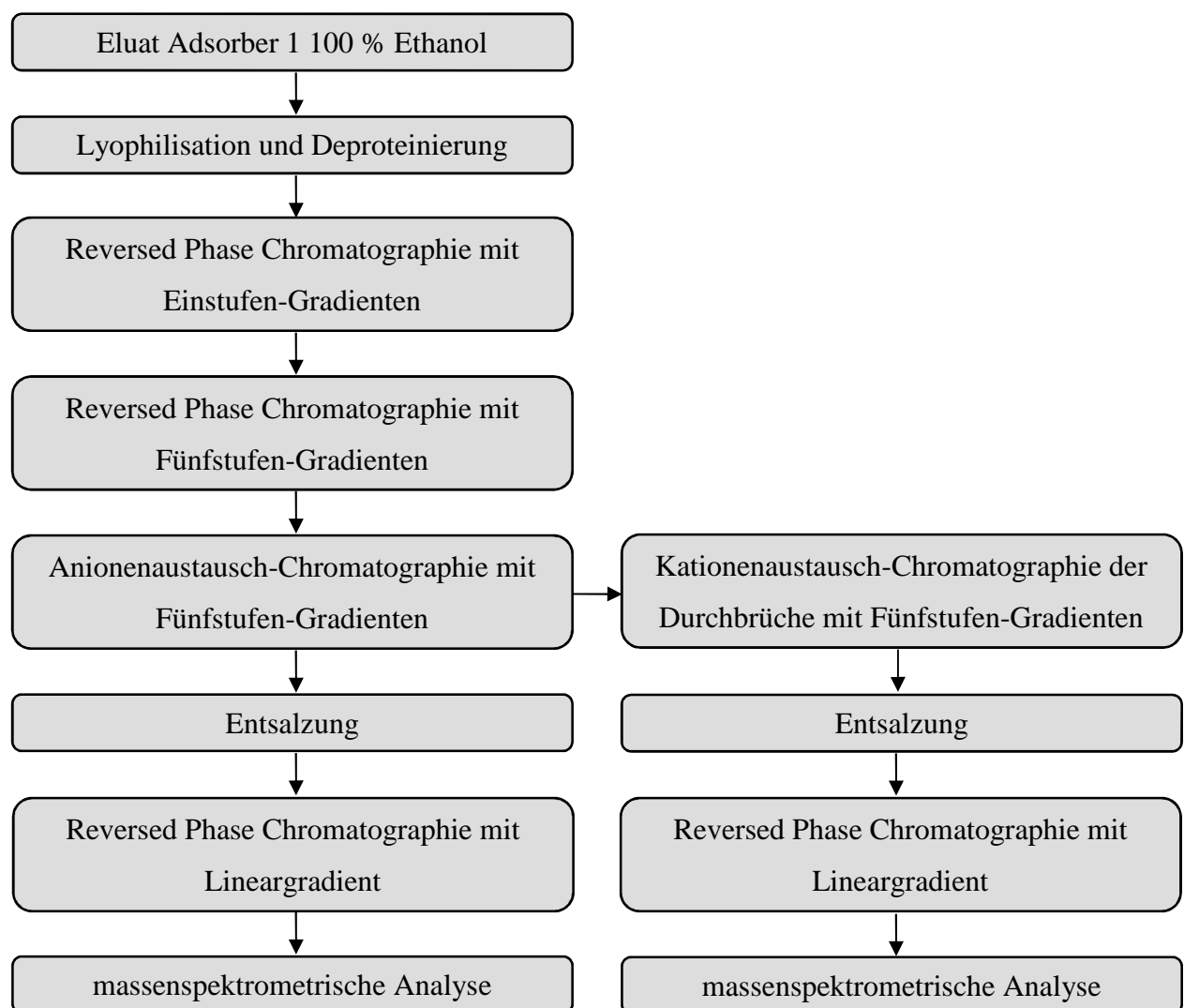


Abbildung 5: Aufreinigungsschema der Eluate des Adsorbers 1 nach Behandlung mit dem Prometheus[®]-System

3.2.2. Deproteinierung mit Perchlorsäure

Die lyophilisierten Proben des Adsorbers 1 wurden zunächst in 200 ml HPLC-Wasser gelöst und je 1 ml der zu deproteinierenden Probe mit 65 µl eiskalter 70 %iger Perchlorsäure langsam versetzt. Die durch ein Eisbad gekühlte Probe wurde im Anschluss 30 s homogenisiert und daraufhin bei 3.000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und mit 15 M Kaliumhydroxid-Lösung (KOH-Lösung) auf einen pH-Wert von 9,0 titriert. Anschließend wurde die Probe für die Dauer von 60 min bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen erneut bei 3.000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und anschließend bei -80 °C verwahrt.

3.2.3. Herstellung des Lösungsmittels

Zunächst wurde eine 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA-Lösung) hergestellt. Dafür wurden zu 100 ml bidestilliertem (bidest.) Wasser 30 ml Essigsäure und 70 ml Triethylamin (TEA) zugegeben. Nachdem die Lösung bei intensivem Rühren abgekühlt war, wurde sie mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure bzw. TEA auf 6,5 eingestellt.

3.2.4. Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Einstufen-Gradienten

Für die Reversed Phase Chromatographie wurde eine LiChroprep[®] RP-18 Fertigsäule der Größe B (310-25, Kieselgelmatrix mit Korngröße 40-63 µm, Merck, Deutschland) verwendet. Die Säule wurde mit 100 ml einer 80 %igen Ethanol-Lösung konditioniert und anschließend mit 100 ml 40 mM TEAA äquilibriert. Vorbereitend wurde die Probe zu einem Zehntel mit 1 M TEAA versetzt und auf einen pH-Wert von 6,5 mit 25 % Salzsäure (HCl) und 2 M Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt. Die 40 ml Probe wurde mittels elektrischer Schlauchpumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und mit 80 % Ethanol eluiert. Die Flussgeschwindigkeit über die Säule betrug 2 ml/min und das gewonnene Eluat wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Alle Chromatographiestritte wurden mit beiden Adsorbereluat durchgeföhrt. Hierzu wurden die Adsorbereluate eines Adsorbers jeweils in zwei Hälften geteilt, mit unterschiedlichen Lösungsmitteln versetzt und aufgetragen. In den folgenden Beschreibungen der einzelnen Chromatographiestritte werden immer nur die Eluate des Adsorbers 1 mit 40 mM TEAA als

Lösungsmittel versetzt und aufgetrennt. Die chromatographische Auftrennung der anderen Hälfte der Adsorbereluate des Adsorbers 1 wurden zu ein Zehntel mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und nach demselben Prinzip aufgetragen.

3.2.5. Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Es wurde eine LiChroprep[®] RP-18 Fertigsäule (310-25, Kieselgelmatrix mit Korngröße 40-63 µm, Merck, Deutschland) verwendet. Diese wurde mit 100 ml 100 %igem Ethanol konditioniert und mit 100 ml 40 mM TEAA in Wasser äquilibriert. Die Proben wurden in HPLC-Wasser gelöst und ergaben ein Endvolumen von 350 ml pro Adsorbereluat. Dieses Volumen wurde in zwei Hälften à 175 ml geteilt und mit 17,5 ml 1 M TEAA bzw. 17,5 ml 0,1 % TFA versetzt. Die Probenlösung wurde mit einem Volumen von 15 ml mittels einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die darauffolgende Stufenelution erfolgte in einem Fünfstufen-Gradienten in 20 % Schritten mit 100 % Ethanol (Eluent B) (siehe **Tabelle 4**). Die Flussgeschwindigkeit über die Säule betrug 3 ml/min. Die resultierenden Fraktionen von ca. 50 ml wurden gesammelt und bei -80 °C verwahrt. Während der Reversed Phase Chromatographie wurde die UV-Absorption mit einer Wellenlänge von 254 nm unter Verwendung eines Leitfähigkeits-Detektors kontinuierlich gemessen.

Tabelle 4: Fünfstufen-Gradienten der präparativen Reversed Phase Chromatographie

Zeit	[min]	40	50	15	15	15	15
Eluent B	[%]	0	20	40	60	80	100
Flussrate	[ml/min]	3	3	3	3	3	3

3.2.6. Präparative Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine mit YMC-BioPro Q75 gefüllte Glassäule (50x4,6 mm, Korngröße 75 µm, Merck, Deutschland) vorbereitet. Diese wurde zunächst mit 300 ml 10 mM HCl gereinigt und im Anschluss mit 200 ml 20 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄) (Eluent A) äquilibriert. Die tiefgekühlten Proben wurden aufgetaut, in 10 ml wässriger 20 mM K₂HPO₄-Lösung gelöst und auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Nach der Probeninjektion von 10 ml erfolgte die Elution in einem Fünfstufen-Gradienten mit 20 mM K₂HPO₄/1 M NaCl-Lösung (Eluent B) in 20 % Schritten von 0 bis 100 %

(siehe **Tabelle 5**). Die Flussgeschwindigkeit betrug 4 ml/min. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden die UV-Absorption sowie die Leitfähigkeit kontinuierlich detektiert. Das fraktionierte Eluat wurde zu ca. 80 ml Fraktionen gesammelt und bei -20 ° C verwahrt.

Tabelle 5: Fünfstufen-Gradienten der präparativen Anionenaustausch-Chromatographie

Zeit	[min]	45	40	20	20	20	15
Eluent B	[%]	0	20	40	60	80	100
Flussrate	[ml/min]	4	4	4	4	4	4

3.2.7. Präparative Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die nicht-retendierte Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie wurde mit Hilfe der Kationenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. Hierzu kam eine mit dem Trägermaterial YMC-BioPro S75 (50x4,6 mm, Korngröße 75 µm, Merck, Deutschland) gestopfte Superformance[®] 300-16 Glassäule zum Einsatz. Die Säule wurde zunächst mit 300 ml bidest. Wasser gereinigt und anschließend mit 200 ml 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) (Eluent A) äquilibriert. Die Fraktion wurde nach dem Auftauen auf einen pH-Wert von 3,5 mit 85 % Phosphorsäure (H₃PO₄) eingestellt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 4 ml/min mit einem Fünfstufen-Gradienten in 20 % Schritten mittels 20 mM KH₂PO₄/1 M NaCl (Eluent B) (siehe **Tabelle 6**). Die UV-Absorption wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Die jeweiligen gewonnenen Fraktionen wurden im Anschluss bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 6: Fünfstufen-Gradienten der präparativen Kationenaustausch-Chromatographie

Zeit	[min]	25	25	20	20	20	15
Eluent B	[%]	0	20	40	60	80	100
Flussrate	[ml/min]	4	4	4	4	4	4

3.2.8. Entsalzung mit Reversed Phase Chromatographie

Zur Reduktion der Salzkonzentration in den Proben wurde eine einstufige Reversed Phase Chromatographie durchgeführt. Hierzu wurde eine LiChroprep[®] RP-18 Fertigsäule (310-25, Kieselgelmatrix mit Korngröße 40-63 µm, Merck, Deutschland) verwendet. Die aufgetauten Proben wurden mit 1 M TEAA versetzt und mit 25 % HCl auf einen pH-Wert von 6,5

eingestellt. Die Säule wurde mit 100 ml 40 mM TEAA (Eluent A) äquilibriert. Das Probenvolumen von 150 ml wurde mit Hilfe eines SuperLoop (335x30 mm, GE Healthcare, Großbritannien) mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min über die Säule gefördert. Die Elution erfolgte nach 40 min in einer Stufe mit 80 %igem Ethanol (Eluent B). Die Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm ermöglichte ein fraktioniertes und selektiertes Sammeln von Eluat, die mit einem Volumen von je 25 ml aufgefangen und für die weitere Auftrennung bei -20 °C verwahrt wurden.

3.2.9. Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten

Eine weitere Auftrennung der chromatographischen Fraktionen erfolgte über eine Reversed Phase Chromatographie mittels Lineargradienten. Es wurden zwei gekoppelte monolithische HPLC-Fertigsäulen Chromolith[®] Performance RP-18e endcapped (4,6-100 mm, Makroporengröße 2 µm, Mesoporengröße 13 nm, Merck, Deutschland) verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 100 ml 40 mM TEAA wurde die in 40 mM TEAA gelöste Probe mittels elektrischer Pumpe mit 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Das Probenvolumen betrug 5 ml. Die lineare Elution wurde mit 80 % Ethanol (Eluent B) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min und einer UV-Detektion von 280 nm durchgeführt. Es wurden 1 ml Fraktionen kontinuierlich gesammelt, für die massenspektrometrische Messung lyophilisiert und anschließend bei -20 °C verwahrt.

3.2.10. Analytische Reversed Phase Chromatographie

Die relevanten Fraktionen wurden mit Hilfe einer Reversed Phase Chromatographie weiter aufgetrennt. Dabei kam eine ZORBAX, SB-C18 (5 µm, 150x0,5 mm, der Firma Agilent, Deutschland) als Chromatographiesäule zum Einsatz. Die Säulentemperatur wurde konstant auf 50 +/- 0,5 °C gehalten. Es wurden 0,1 % Ameisensäure in Wasser (Eluent A) und 0,1 % Ameisensäure in Azetonitril (Eluent B) als Lösungsmittel verwendet. Der automatisierte Probengeber (G1377A, Agilent, Deutschland) injizierte 0,1 µl der Probe mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 10 µl/min und die Flussrate über die Säule betrug 50 µl/min. Für die Elution wurde folgender Gradient verwendet (siehe **Tabelle 7**).

Tabelle 7: Analytische Reversed Phase Chromatographie für die massenspektrometrische Messung

Zeit	[min]	22	17	12
Eluent B	[%]	2	2-98	98
Flussrate	[μ l/min]	50	50	50

3.2.11. Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie

Die Detektion der relevanten Fraktion erfolgte in einem HCT (high capacity ion trap) Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Deutschland). Die ESI-Massenspektrometrie wurde im positiven Modus durchgeführt. Bei einer Scan-Geschwindigkeit von 8.100 m/z in der Sekunde wurden die ESI-Massenspektren in einem Massen-Intervall von 50-1.500 m/z gemessen. Das Massenspektrometer wurde auf eine Masse von 500 m/z mittels eines smart parameter mode (SPS-Modus) getunt. Die Akkumulationszeit wurde auf 200 ms eingestellt. Die Kapillarspannung betrug 1.500-4.500 Volt (V) und die Temperatur zur Desolvatisierung an der Transferkapillare wurde auf 300 °C festgelegt. Mit einer Flussrate von 8 L/min wurde das Trocknungsgas zugeführt. Das Trocknungsgas wurde auf einen Druck von 20 psi eingestellt. Zur Aufnahme der MS²-Fragmentspektren der unbekannt Substanzen wurde das Mutter-Ion mit einer Intensität über 20.000 Counts mit einem Massenfenster von 4 m/z isoliert und mittels SmartFrag-Mode fragmentiert. Dieser verändert die voreingestellte Fragmentierungsamplitude (1V) von 30-200 %, um eine optimale Fragmentierung der unbekannt Komponenten zu erreichen. Das HCT-Massenspektrometer ist mit einem Computer mit der Compass 4.0-Software (Bruker Daltonic, Deutschland) zur Steuerung des Systems verbunden. Mit Hilfe des Programms HyStar 3.2 (Bruker Daltonic, Deutschland) wurden die Spektren aufgenommen und mit DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonic, Deutschland) gespeichert und analysiert.

3.3. Aufreinigung des anionischen Adsorbers (Adsorber 2)

3.3.1. Elution der Substanzen von dem Adsorber 2

Nach der Behandlung mit dem Prometheus[®]-System wurden die Adsorber-Kartuschen dem Gerät zur Aufreinigung entnommen. Zur Elution der retendierten Substanzen wurde der Adsorber 2 mit Hilfe eines Schlauchsystems (Fresenius) und einer Schlauchpumpe (Fresenius) mit 1 Liter 2 M NaCl gespült und die Lösung bei -80 °C verwahrt. Die Aufreinigung der gewonnenen Probenvolumen erfolgte nach untenstehendem Schema. (**Abbildung 6**)

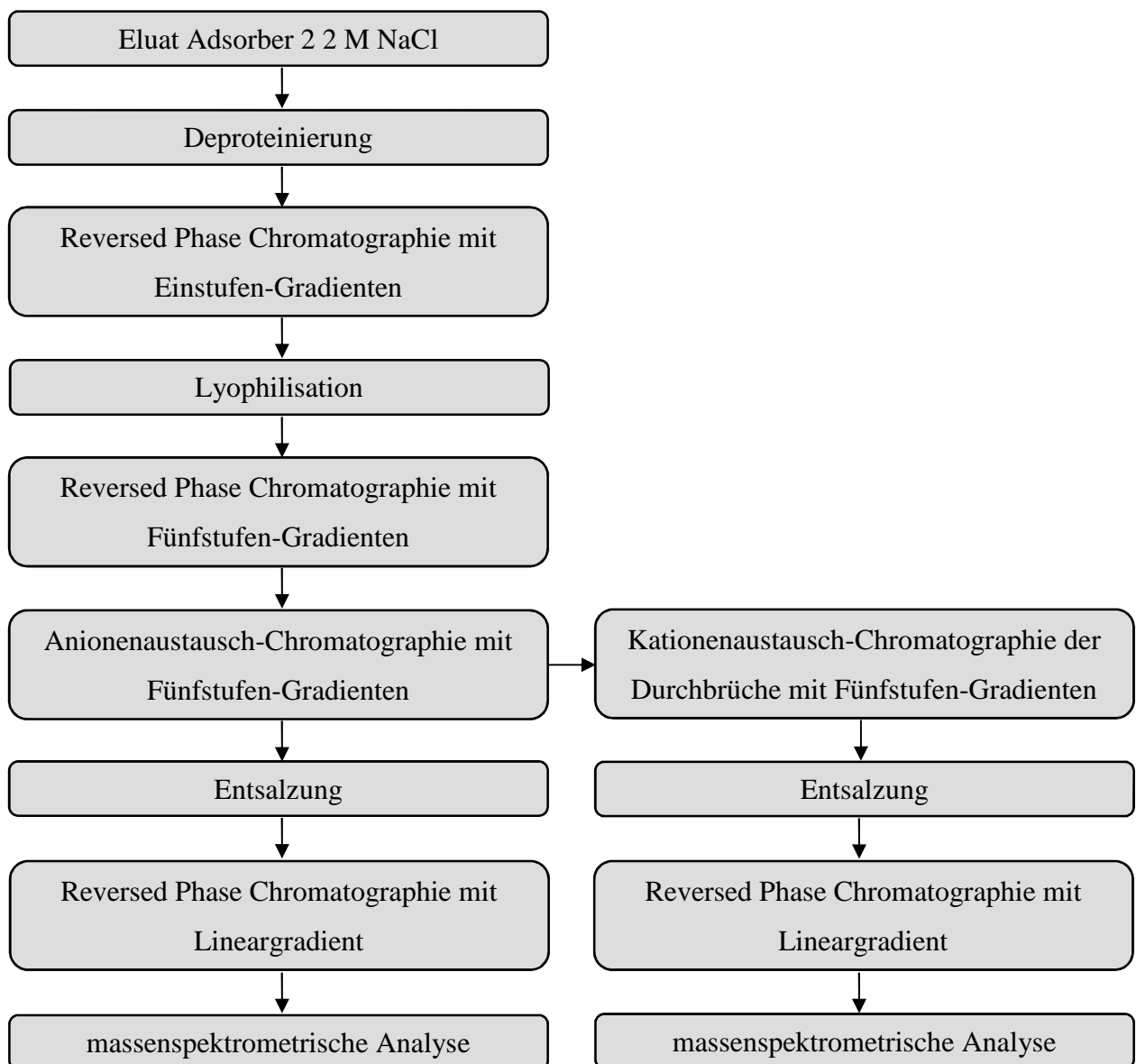


Abbildung 6: Aufreinigungsschema der Eluate des Adsorbers 2 nach Behandlung mit dem Prometheus[®]-System

3.3.2. Deproteinierung mit Perchlorsäure

Zunächst erfolgte die Deproteinierung mit Perchlorsäure nach demselben Prinzip wie in **Abschnitt 3.2.2** beschrieben.

3.3.3. Präparative Reversed Phase Chromatographie mit Einstufen-Gradienten

Im Anschluss an die Deproteinierung der Eluate des Adsorbers 2 wurde eine Reversed Phase Chromatographie mit Einstufen-Gradienten analog zu dem in **Abschnitt 3.2.4** genannten Verfahren durchgeführt. Die auf diese Weise gewonnenen Eluate wurden lyophilisiert und bei -20 °C verwahrt.

3.3.4. Chromatographische Aufarbeitung

Die weitere chromatographische Auftrennung erfolgte in gleicher Art und Weise wie in den **Abschnitten 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8, 3.2.9** und **3.2.10** beschrieben.

3.3.5. Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Messung erfolgte nach demselben Prinzip wie bereits in **Abschnitt 3.2.11** erläutert.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemein

Im Anschluss an die Behandlung mit dem Prometheus[®]-System erhielten wir die beiden Adsorber 1 und 2. Diese wurden gespült und die erhaltene Eluate wurden gemäß dem Schema in **Abbildung 5** und **Abbildung 6** aufgetrennt. Die Adsorber 1 und 2 wurden unabhängig voneinander aufgereinigt und die Ergebnisse werden unter **4.2.** und **4.3.** dargestellt. Beide Adsorbereluate wurden zu einer Hälfte mit den Ionenpaarreagenzien TEAA bzw. die andere Hälfte mit TFA, zur Maskierung der Ladungen, versetzt. Im Ergebnisteil wird aufgrund der Fülle an entstanden Chromatogrammen immer nur ein beispielhaftes Chromatogramm pro Aufreinigungsschritt mit TEAA bzw. TFA versetzter Probe präsentiert. Alle anderen Fraktionen wurden nach demselben Prinzip aufgearbeitet und weiter fraktioniert. Aus jeder mittels Lineargradienten chromatographisch aufgetrennten Fraktion wurde der jeweils dominante Peak bestimmt und massenspektrometrisch analysiert. Die Identifizierung der unbekannt Substanzen erfolgte mittels einer datenbankgestützten Onlinesuche mit MassBank und Mascot.

4.2. Ergebnisse Adsorber 1

4.2.1. Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Zur Auftrennung der Eluate wurde eine Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten in 20 %-Schritten durchgeführt. Das Probenvolumen wurde zuvor in zwei Hälften geteilt und je eine Hälfte mit 1 M TEAA bzw. die andere Hälfte mit 0,1 % TFA versetzt.

In der **Abbildung 7** ist beispielhaft ein Chromatogramm der mit TEAA (**Abbildung 7 A**) sowie mit TFA versetzten Probe (**Abbildung 7 B**) dargestellt. Das Chromatogramm in **Abbildung 7 A** zeigt mehrere Peaks, die mittels Stufengradienten entstanden sind. Der erste UV-Absorptionspeak erstreckt sich von der 12. bis zur 35. Minute und beinhaltet Substanzen, die nicht an die Säule gebunden haben. Die beiden dominanten Peaks sind in der 20 %- und 40 %-Fraktion zu finden, während ein weiterer, deutlich geringerer, in der 80 %-Fraktion angesiedelt ist. Der Peak in der 20 %-Fraktion eluiert über einen Zeitraum von der 42. bis zur 85. Minute. Dieser breite Peak setzt sich zusammen aus zwei nicht basisliniengetrennten Peaks. Der 40 %-Fraktionspeak eluiert von der 95. bis zur 110. Minute und der Peak in der 80 %-Fraktion von der 120. bis zur 130. Minute. Die Elutionszeiten der beiden dargestellten Chromatogramme

unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Die beiden dominanten Peaks sind in der mit TFA versetzten Probe (**Abbildung 7 B**), genau wie im obigen Chromatogramm in der 20 %- und 40 %-Fraktion zu finden. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden zur weiteren Auftrennung wie folgt gesammelt: Die nicht retendierten Eluate als Durchbruch (DB) von 0 bis 40 Minuten, die 20 %-Fraktion von 40 bis 90 Minuten, die 40 %-Fraktion von 90 bis 105 Minuten, die 60 %-Fraktion von 105 bis 120, die 80 %-Fraktion von 120 bis 135 Minuten und die 100 %-Fraktion von 135 bis 150 Minuten. Aufgrund der fehlenden UV-Absorption wurde die 100 %-Fraktion in der weiteren Auftrennung vernachlässigt. Die restlichen Fraktionen wurden bei -20°C verwahrt.

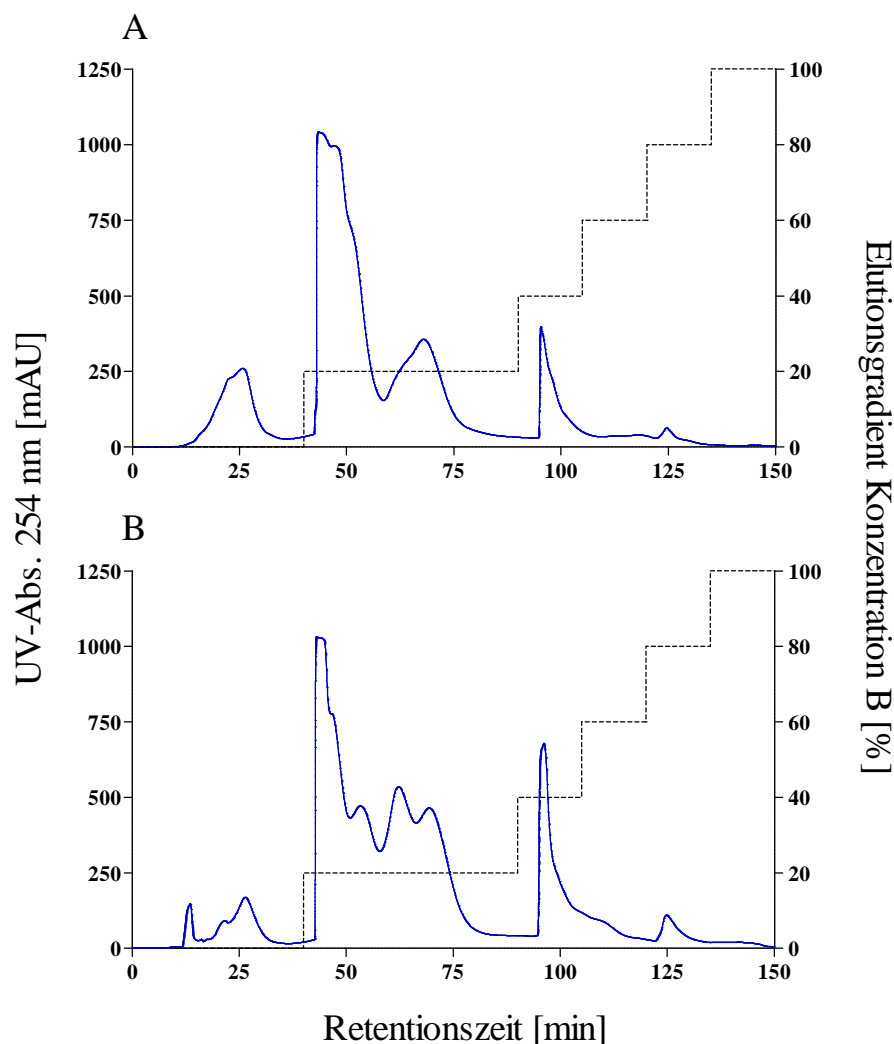


Abbildung 7: Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von den Eluaten des Adsorbers 1; (**A**) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; (**B**) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 254 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (100 % Ethanol) (-----)

4.2.2. Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die in der Reversed Phase Chromatographie durch die Stufenelution erhaltenen Fraktionen wurden zur weiteren Auftrennung einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Die Elution erfolgte in einem Fünfstufen-Gradienten in 20 %-Schritten. Auf diese Weise wurde jede der zuvor erhaltenen Fraktion der Reversed Phase Chromatographie (DB, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %) in sechs weitere Fraktionen aufgetrennt. Die **Abbildung 8** zeigt die Auftrennung des dominanten 20 %-Peaks aus der zuvor durchgeführten Reversed Phase Chromatographie. In dem UV-Absorptionsprofil ist zu erkennen, dass die beiden dominanten nicht basisliniengetrennten Peaks bereits im Durchbruch von der 5. bis zur 45. Minute eluieren. Darüber hinaus finden sich kleinere Peaks in der 20 %-Fraktion sowie ein Weiterer in der 40 %- und 60 %-Fraktion der TEAA versetzten Probe (**Abbildung 8 A**). In der 80 %- und 100 %-Fraktion ist keine relevante Absorption zu verzeichnen. Die Auftrennung des 20 %-Peaks der mit TFA versetzten Probe (**Abbildung 8 B**) zeigt ein ähnliches, wenn auch höher aufgetrenntes UV-Absorptionsprofil. Der dominante Peak gliedert sich in zwei fast basisliniengetrennten Peaks. Ein Weiterer, doch deutlich geringerer Peak ist in der 20 %-Fraktion zu finden. Anschließend verläuft die Kurve basislinienkonform. Die 100 %-Fraktionen wurden im Folgenden nicht mehr aufgetrennt. Alle anderen Fraktionen wurden gesammelt und zur weiteren Auftrennung bei -20 °C verwahrt.

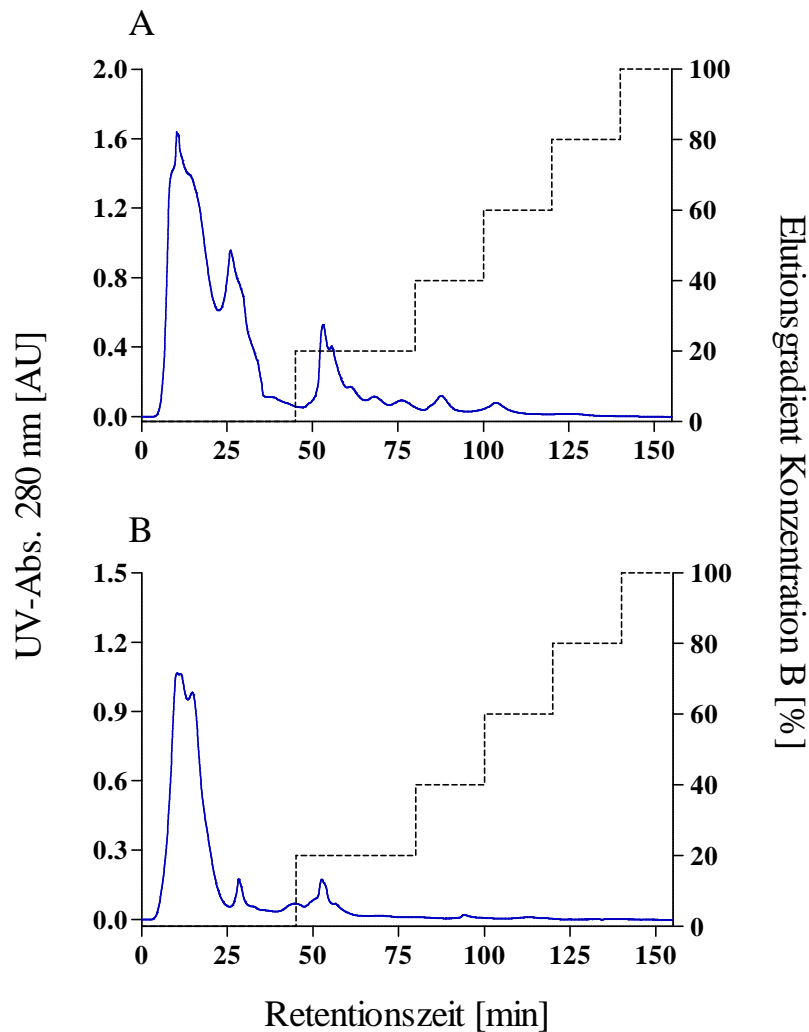


Abbildung 8: Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von der 20 %-Fraktion der Reversed Phase Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1; (A) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM K₂HPO₄; (B) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM K₂HPO₄; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (20 mM K₂HPO₄/1 M NaCl) (-----)

4.2.3. Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die nicht am Trägermaterial der Anionenaustausch-Chromatographie retendierten Eluate wurden als Durchbruch gesammelt und mittels Kationenaustausch-Chromatographie erneut aufgetrennt. Dies erfolgte in einem Fünfstufen-Gradienten in 20 %-Schritten. Das in der **Abbildung 9** dargestellte Kationenaustausch-Chromatogramm gibt exemplarisch ein UV-Absorptionsprofil des Durchbruchs der Anionenaustausch-Chromatographie wieder. Der höchste Peak erstreckt sich in der **Abbildung 9 A** zwischen der 5. und der 20. Minute und beinhaltet somit Substanzen, die nicht an der Säule gebunden haben. Die nachfolgenden detektierten Peaks befinden sich in der 20 %-Fraktion (30 bis 40. Minute) und zwei breitere, basisliniengetrennte Peaks in der

40 %-Fraktion von der 45. bis zur 70. Minute. In den 60 %-, 80 %- und 100 %-Fraktionen zeigt sich ein Kurvenverlauf entlang der Basislinie. Bei der mit TFA versetzten Probe (**Abbildung 9 B**) ist die Säulenkapazität überschritten worden, sodass die Substanzen bereits bei null Minuten bis zur 25. Minute eluieren. Es folgen ein kleiner Peak in der 20 %-Fraktion von der 30. bis 45. Minute sowie ein größerer Peak von der 50. bis zur 70. Minute in der 40 %-Fraktion. Daraufhin ist ein der Basislinien entlanglaufender Kurvenverlauf zu verzeichnen. Aufgrund des fehlenden UV-Absorptionsprofils in der 80 %- und 100 %-Fraktion wurden diese zur weiteren Isolierung und Identifizierung nicht in Betracht gezogen.

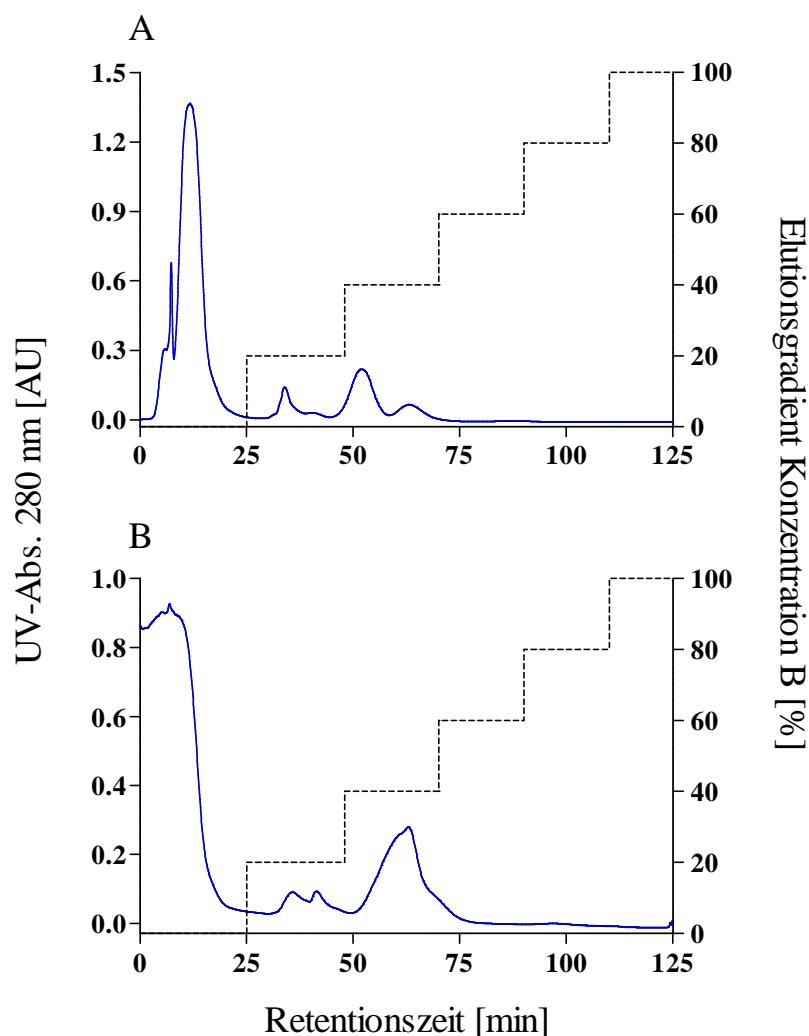


Abbildung 9: Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten vom DB der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1; (A) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM KH₂PO₄; (B) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM KH₂PO₄; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (20 mM KH₂PO₄/ 1 M NaCl) (-----)

4.2.4. Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten

Nach der Entsalzung mittels einstufiger Reversed Phase Chromatographie mit 80 % Ethanol schloss sich eine Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten an. Dadurch wurden die einzelnen Fraktionen der Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie linear aufgetrennt. Die **Abbildung 10** zeigt zwei beispielhafte Chromatogramme der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten. Dabei zeigt sich je nach Fraktion, Adsorber und versetztem Lösungsmittel ein unterschiedliches UV-Absorptionsprofil.

In der **Abbildung 10 A** ist das Chromatogramm der 80 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie, die mittels Lineargradienten aufgetrennt wurde, dargestellt. Hierbei wurde TEAA als Lösungsmittel verwendet. Es sind mehrere basisliniengetrennte Peaks über einen Zeitraum von der 13. bis zur 68. Minute zu erkennen. Der intensivste UV-Absorptionspeak eluiert in der 21. bis 22. Minute und ist mit einem Pfeil markiert. Das vergleichende Chromatogramm der gleichen Fraktion mit TFA versetzter Probe ist in **Abbildung 10 B** dargestellt. Es sind ebenfalls mehrere basisliniengetrennte Peaks zu erkennen. Der intensivste UV-Absorptionspeak eluiert von der 37. bis zur 39. Minute und ist ebenfalls mit einem Pfeil markiert. Das UV-Absorptionsprofil unterscheidet sich im Vergleich zur **Abbildung 10 A** durch eine geringere UV-Absorptionsintensität und unterschiedlichen Elutionszeiten. Beide Chromatogramme zeigen eine gute Auftrennung mit scharfen, basisliniengetrennten Peaks. Sämtliche Fraktionen wurden kontinuierlich gesammelt und die beiden pfeilmarkierten Fraktionen anschließend massenspektrometrisch bestimmt.

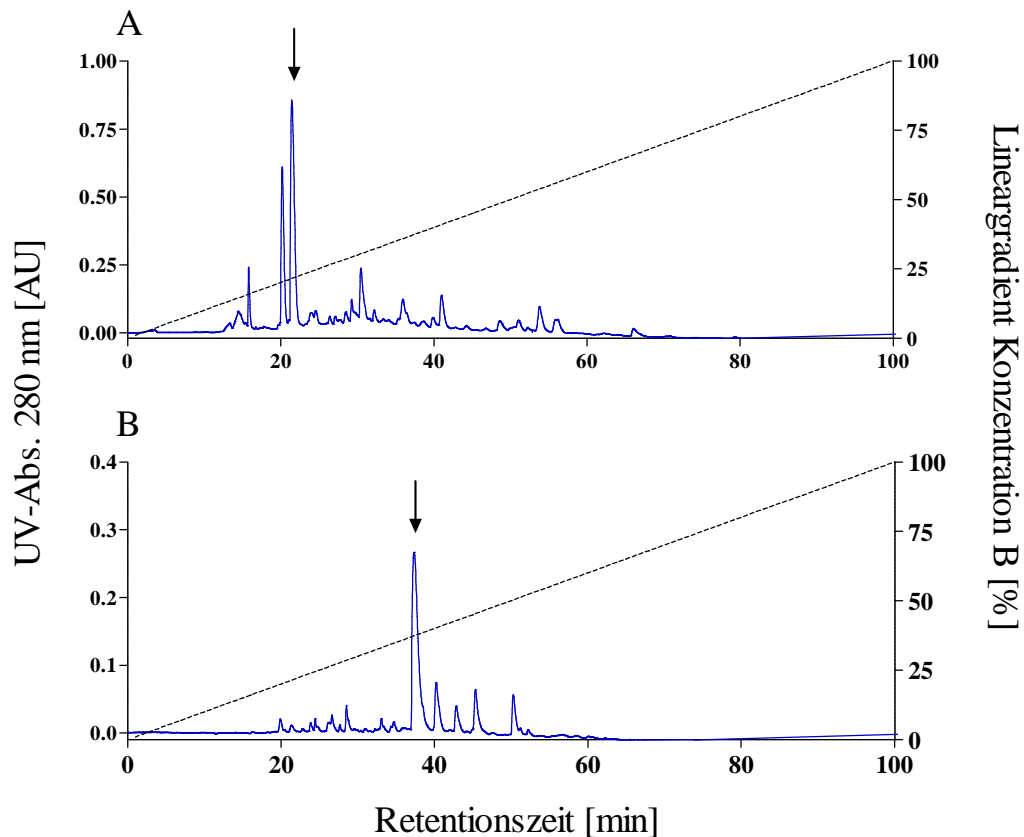


Abbildung 10: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 80 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1; **(A)** mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; **(B)** mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Lineargradient Konzentration B (80 % Ethanol) (-----)

Ein weiteres repräsentatives Chromatogramm der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten für die 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie ist in **Abbildung 11 A** mit TEAA versetzter und in **Abbildung 11 B** mit TFA versetzter Probe dargestellt. Auch in dieser Abbildung unterscheiden sich die beiden Chromatogramme hinsichtlich der Elutionszeiten sowie der Intensität der UV-Absorption. Der intensivste UV-Absorptionspeak der mit TEAA versetzten Probe eluiert von der 15. bis zur 18. Minute und in der mit TFA versetzten Probe von der 49. bis 50. Minute. Die intensivsten Peaks wurden mit einem Pfeil markiert und anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Sämtliche weitere Fraktionen wurden gesammelt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

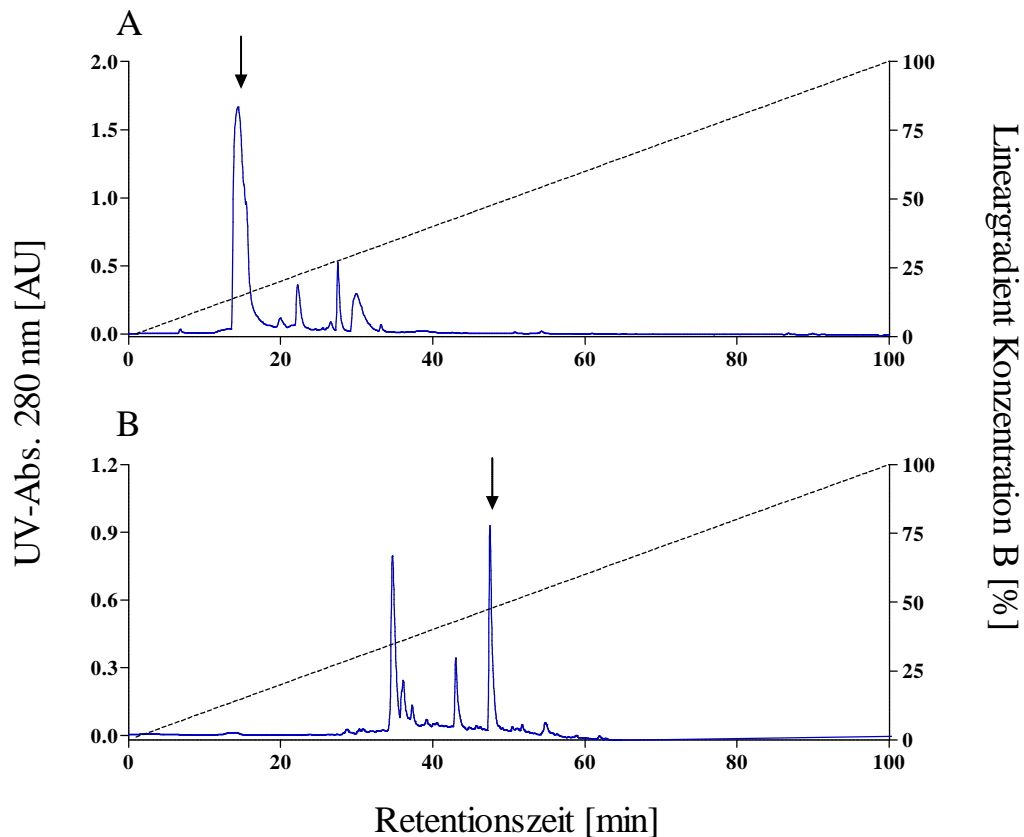


Abbildung 11: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1; **(A)** mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; **(B)** mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Lineargradient Konzentration B (80 % Ethanol) (-----)

4.2.5. Analytische Reversed Phase Chromatographie

Der jeweils intensivste UV-Absorptionspeak pro Fraktion wurde zur massenspektrometrischen Messung mittels Reversed Phase Chromatographie aufgetrennt. Die **Abbildung 12** zeigt exemplarisch das Chromatogramm der zuvor in **Abbildung 11 B** pfeilmarkierten Fraktion der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten von der 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie. Durch die analytische Reversed Phase Chromatographie wurde der zuvor markierte Absorptionspeak von Verunreinigung gereinigt und weiter aufgetrennt. Das erhaltene Chromatogramm zeigt vier intensive Peaks. Das ESI-Massenspektrum eines jeden Peaks wurde analysiert und ausgewertet. Der Pfeil markiert den Peak, des in **Abbildung 13** dargestellten Massenspektrums.

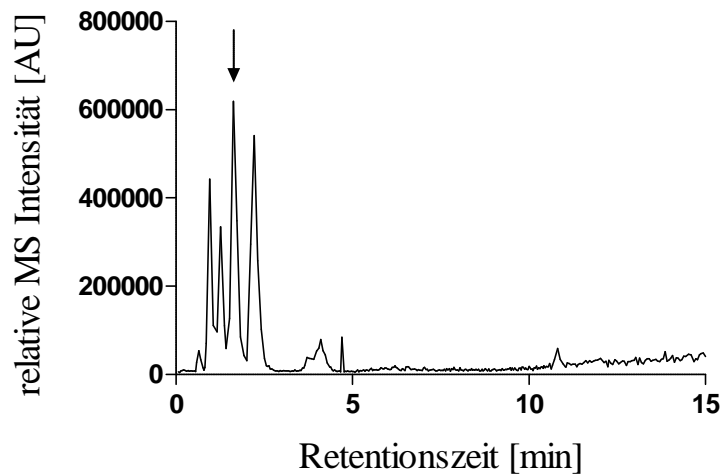


Abbildung 12: Analytische Reversed Phase Chromatographie des intensivsten UV-Absorptionspeaks der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten von der 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1

4.2.6. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die relevante Fraktion der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten wurde mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie analysiert. In **Abbildung 13** ist ein repräsentatives ESI-Massenspektrum von der in **Abbildung 12** pfeilmarkierten Fraktion der analytischen Reversed Phase Chromatographie dargestellt.

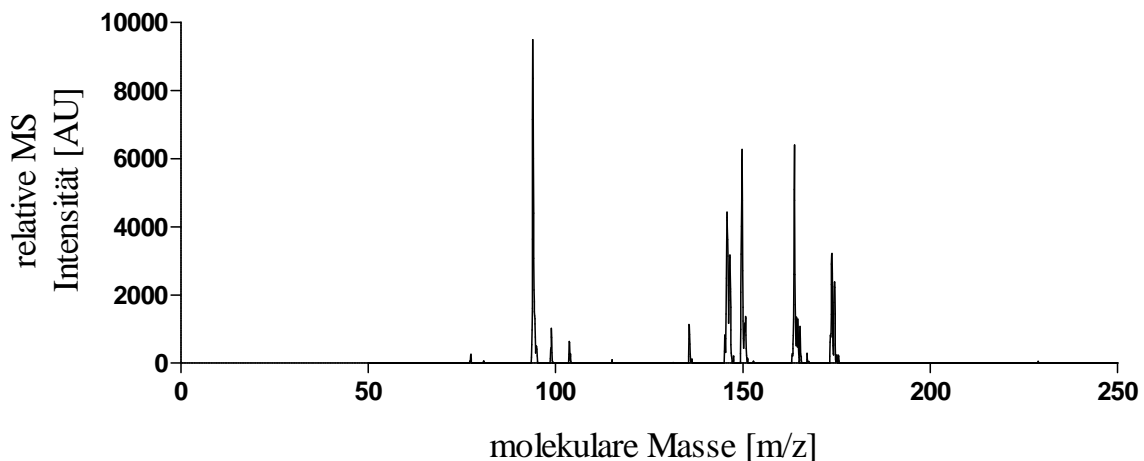


Abbildung 13: ESI-Massenspektrum der zuvor pfeilmarkierten Fraktion der analytischen Reversed Phase Chromatographie

Zur Identifizierung der Substanzen aus den erhaltenen ESI-Massenspektren wurde eine datenbankgestützte Onlinesuche mit MassBank und Mascot durchgeführt.

4.2.7. Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit MassBank

Die Identifizierung der Substanzen wurde mit der Datenbank MassBank durchgeführt. Die Suchparameter umfassten eine Spektrumsuche mit einer Toleranz des Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) von 0,3 Units, Instrumententyp: ESI, MS-Typ: alle und positiver Ionenmodus. Der Vorteil der Fragmentspektrensuche ist, dass zur Identifizierung der Substanzen nicht nur die molekulare Masse, sondern auch die Fragmentspektren mit einbezogen werden [101]. Dadurch ist eine differenziertere und spezifischere Auswertung der unbekannt Substanzen möglich. Die **Abbildung 14** zeigt den Vergleich des zuvor in **Abbildung 13** gezeigten Massenspektrums (oben, grüner Bereich) in Abgleich mit dem Massenspektrum der Datenbank (unten, oranger Bereich). Alle übereinstimmenden Massenpeaks sind farbig hervorgehoben und ihre Massenzahl ist beziffert. Anhand des sehr ähnlichen Massenspektrums und eines von der Datenbank errechneten Scores von 0,77 ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Substanz um das Urämietoxin Kynurenin handelt.

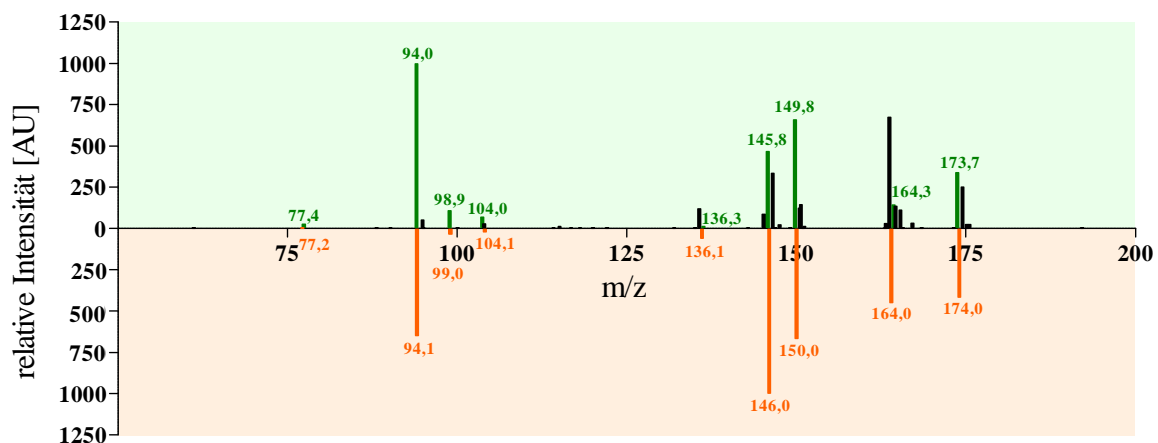


Abbildung 14: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des Urämietoxins Kynurenin

Ein weiteres Beispiel für eine identifizierte Substanz zeigt die **Abbildung 15**. Bei diesem Fragmentspektrum handelt es sich laut Datenbank MassBank um den therapeutischen Metaboliten Metoprolol.

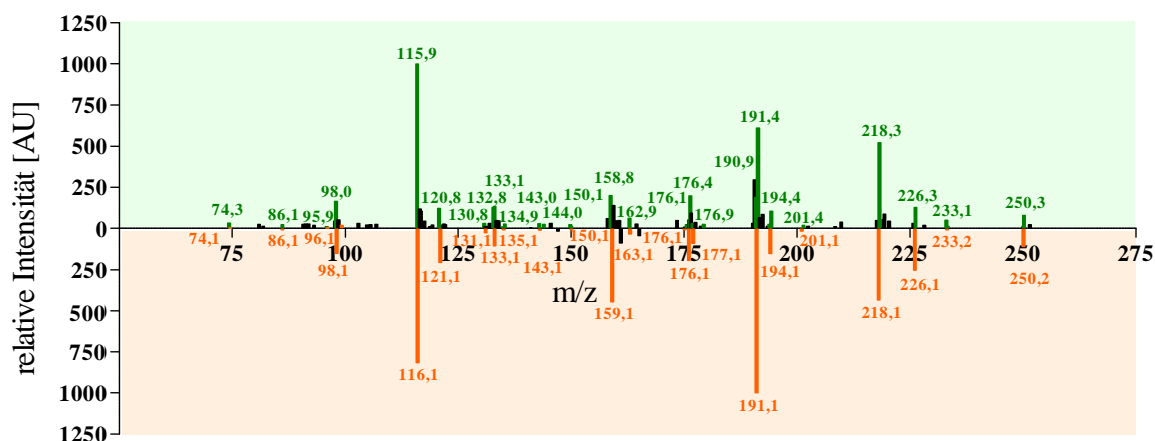


Abbildung 15: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des therapeutischen Metaboliten Metoprolol

Mit Hilfe der datenbankgestützten Suche konnten 53 Substanzen identifiziert werden. Die **Tabelle 8** zeigt alle signifikant gefundenen Substanzen (Score > 0,6) der ausgewerteten ESI-Massenspektren mit der Datenbank MassBank der analysierten Fraktionen von den Eluaten des Adsorbers 1. Bei der Mehrzahl der identifizierten Substanzen (25 Stoffe) handelt es sich um therapeutische Metabolite. Des Weiteren konnten zwei proteingebundene Urämietoxine (Indolessigsäure und Kynurenin) identifiziert werden. Bei den restlichen Substanzen handelt es sich um ein heterogenes Substanzgemisch.

Tabelle 8: Alle Substanzen aus den Eluaten des Adsorbers 1 die mittels der Datenbank MassBank als signifikant identifiziert wurden

Substanznamen	MW	Stoffgruppe
1-(2,3-Dibenzimidazol-2-ylpropyl)-2-Methoxybenzen	382,19	therapeutischer Metabolit
11-Nor-9-Carboxy-Delta-9-THC	344,2	THC
4-Acetamidoantipyrin	245,12	therapeutischer Metabolit
5-Chloro-2-Methyl-4 Isothiazolin-3-on	148,97	Isothiazolinon
5-Hydroxyindolylessigsäure	191,06	Serotoninmetabolit
5-Methylthioadenosin	297,09	Adenosin
A-Aminopentansäure	117,08	Lysinabbauprodukt
Aspartylphenylalanin	280,11	Aminosäure
Benzamidin	120,07	Amidderivat von Benzol

Ergebnisse

Biotin	244,09	Vitamin B7/H
Clozapine N-Oxide	342,12	therapeutischer Metabolit
Coptisine	320,09	therapeutischer Metabolit
Cyanidin	1051,29	Anthocyanidin
Diltiazem	414,16	therapeutischer Metabolit
Diuron	232,02	Phenylharnstoffderivat
EDDP	277,18	therapeutischer Metabolit
Ethylmorphin	313,17	therapeutischer Metabolit
Gamma-Glutamylphenylalanin	294,12	Dipeptid
Glucosaminsäure	195,07	Aminozucker
Glutamin	146,07	Aminosäure
Hydrocortison	362,21	Hormon
Hydroxy-Haloperidol	377,16	therapeutischer Metabolit
Hydroxyurea	76,03	therapeutischer Metabolit
Indolessigsäure	205,07	Urämietoxin
Kynurenin	208,08	Urämietoxin
L-Tryptophan	204,09	Aminosäure
Lenacil	234,14	Uracilderivat
Lysin	146,11	Aminosäure
Methysergid	353,21	therapeutischer Metabolit
Metoprolol	267,18	therapeutischer Metabolit
Milnacipran	290,19	therapeutischer Metabolit
Modafinilsäure	274,07	therapeutischer Metabolit
Na-Benzenolargininethylester	306,17	Vasodilatator
N-Acetylphenylalanin	207,09	Aminosäure
Nalidixinsäure	232,08	therapeutischer Metabolit
Nitrazepam	281,08	therapeutischer Metabolit
Norclobazam	286,05	therapeutischer Metabolit
Octopin	246,13	Guanedinderivat
Omeprazol	345,11	therapeutischer Metabolit
Oxamniquin	279,16	therapeutischer Metabolit
p-Chlorodisopyramid	373,19	therapeutischer Metabolit
p-Hydroxyminaprin	314,17	therapeutischer Metabolite
Pheniramin	240,16	therapeutischer Metabolit
Progesteron	314,22	Gestagen/Hormon
Protriptylin	263,16	therapeutischer Metabolit
Ranitidin	314,14	therapeutischer Metabolit
S-Adenosyl-L-Homocystein	384,12	Aminosäure-Derivat
Safranin	315,16	Farbstoff/Phenazin
Sultoprid	354,16	therapeutischer Metabolit
Tetrameprozin	327,18	therapeutischer Metabolit
TRH	362,17	Schilddrüsenhormon
Trimethylsulfonium	77,04	Kation
Tyrosinmethylester	195,09	Aminosäure

4.2.8. Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit Mascot

Zur Identifizierung der massenspektrometrisch gemessenen Spektren wurde des Weiteren eine Suche mit der Datenbank Mascot durchgeführt. Es wurden folgende Suchkriterien verwendet: Type of search: MS/MS Ion Search, Database: NCBI nr, Enzyme: no cleave, Taxonomy: Homo sapiens (human), Mass values: Monoisotopic, Peptide Mass Tolerance: ± 0.5 Da, Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da, Instrument type: ESI-TRAP.

Mit Hilfe der Datenbank Mascot konnte das Urämietoxin Interleukin-6 identifiziert werden.

4.3. Ergebnisse Adsorber 2

4.3.1. Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die getrockneten Eluate wurden gelöst und in zwei gleichgroße Probenvolumina geteilt. Dabei wurde jeweils eine Hälfte mit 1 M TEAA und die Andere mit 0,1 % TFA zu 10 % versetzt und aufgetragen. Die Fraktionierung wurde mittels Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten in 20 % Schritten durchgeführt, welche in **Abbildung 16** beispielhaft dargestellt ist. Die **Abbildung 16 A** zeigt das Chromatogramm mit TEAA versetzter Probe. Die dominanten Peaks befinden sich in der 20 %- und 40 %-Fraktion. Des Weiteren eluiert ein kleinerer Peak in der 60 %-Fraktion sowie ein weiterer in der 100 %-Fraktion. Das Chromatogramm mit TFA versetzter Probe (**Abbildung 16 B**) zeigt ein ähnliches UV-Absorptionsprofil. In der 20 %-Fraktion findet man neben dem dominanten Peak einen Weiteren, der sich von der 48. bis zur 60. Minute erstreckt. Darüber hinaus ist die UV-Absorptionsintensität der Peaks in der 40 %-, 60 %- und 100 %-Fraktion etwas höher. Sie eluieren aber im gleichen Zeitraum. Die einzelnen Fraktionen wurden folgendermaßen gesammelt: Die nicht an die Säule gebundenen Eluate als Durchbruch (DB) von 0 bis 35 Minuten, die 20 %-Fraktion von 35 bis 75 Minuten, die 40 %-Fraktion von 75 bis 95 Minuten, die 60 %-Fraktion von 95 bis 115, die 80 %-Fraktion von 115 bis 135 Minuten und die 100 %-Fraktion von 135 bis 160 Minuten. Alle Fraktionen wurden gesammelt und bei -20 °C gelagert.

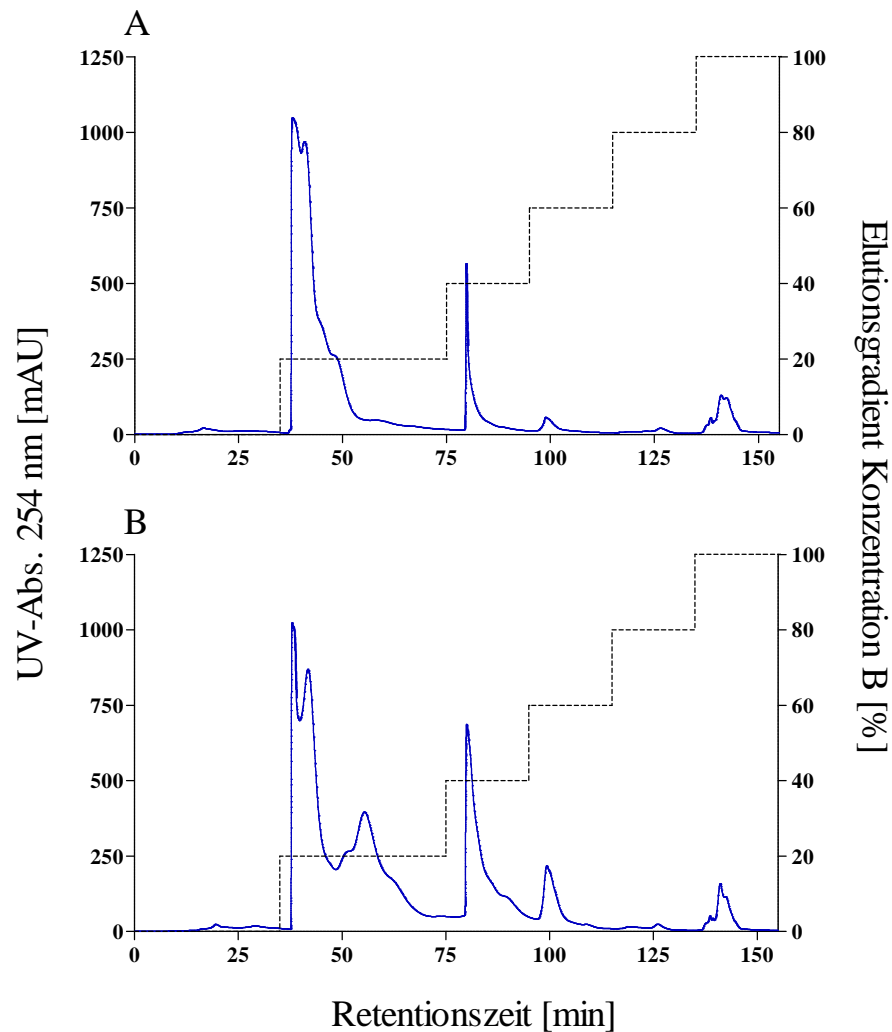


Abbildung 16: Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von den Eluaten des Adsorbers 2; (A) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; (B) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 254 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (100 % Ethanol) (-----)

4.3.2. Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die in der zuvor durchgeführten Reversed Phase Chromatographie entstandenen Fraktionen wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt. Die Elution fand in einem Fünfstufen-Gradienten in 20 %-Schritten statt. Auf diese Weise wurde jede Fraktion der Reversed Phase Chromatographie (DB, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 %) wieder in 20 %-Schritten fraktioniert. Die **Abbildung 17** zeigt beispielhaft ein Chromatogramm der 20 %-Fraktion der Reversed Phase Chromatographie. In **Abbildung 17 A** ist das Anionenaustausch-Chromatogramm der mit TEAA versetzten Probe dargestellt. Insgesamt sind drei intensive Peaks zu erkennen. Die Substanzen des ersten eluieren im Durchbruch und beinhaltet somit

Substanzen, die nicht an der Säule gebunden haben. Der intensivste Peak befindet sich in der 20 %-Fraktion. Des Weiteren eluiert ein deutlich geringerer Peak in der 40 %-Fraktion. Daraufhin verläuft die UV-Absorptionskurve entlang der Basislinie. Das in **Abbildung 17 B** dargestellte Chromatogramm mit der TFA versetzten Probe zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie in **Abbildung 17 A**. Es sind drei Peaks zu detektieren. Der intensivste Peak befindet sich ebenfalls in der 20 %-Fraktion. Aufgrund des fehlenden UV-Absorptionsprofils in der 100 %-Fraktion wurde diese nicht weiter aufgearbeitet. Alle anderen Fraktionen wurden gesammelt und zur weiteren Auftrennung gelagert.

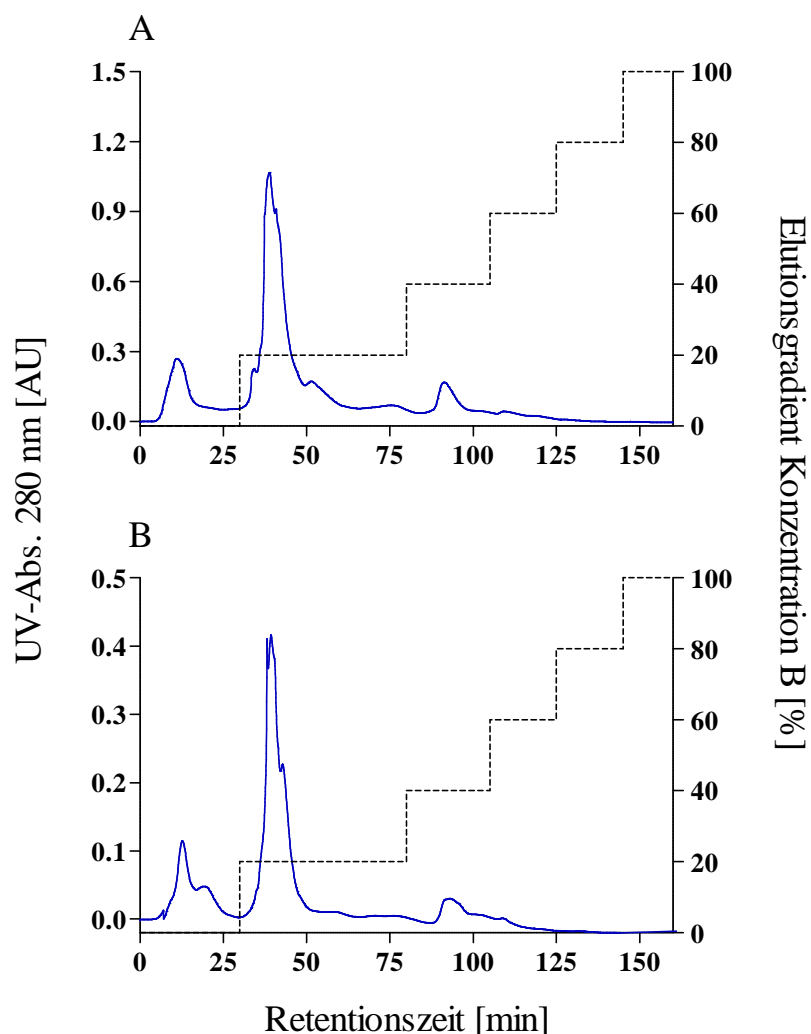


Abbildung 17: Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von der 20 %-Fraktion der Reversed Phase Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2; (**A**) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM K_2HPO_4 ; (**B**) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM K_2HPO_4 ; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (20 mM K_2HPO_4 /1 M NaCl) (-----)

4.3.3. Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten

Die aufgrund der chemischen Eigenschaften nicht an dem Trägermaterial der Anionenaustausch-Chromatographie gebundenen Eluate (Durchbruch) wurden mit Hilfe der Kationenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt. Die Durchbrüche wurden mit einem Fünfstufen-Gradienten je 20 %-Schritten fraktioniert.

Die **Abbildung 18** gibt beispielhaft zwei Kationenaustausch-Chromatogramme der Durchbrüche der Anionenaustausch-Chromatographie einmal mit TEAA (**Abbildung 18 A**) und einmal mit TFA versetzter Probe (**Abbildung 18 B**) wieder. In beiden Chromatogrammen ist ein dominanter Peak in der 40 %-Fraktion zu finden. Die UV-Absorptionsintensität ist niedrig. Wegen der fehlenden UV-Absorptionsprofile auch in den anderen Kationenaustausch-Chromatogrammen wurden die 80 %- und 100 %-Fraktion zur Analyse der unbekannt Substanzen nicht weiter aufgearbeitet. Alle anderen Fraktionen wurden gesammelt und mittels Reversed Phase Chromatographie weiter aufgetrennt.

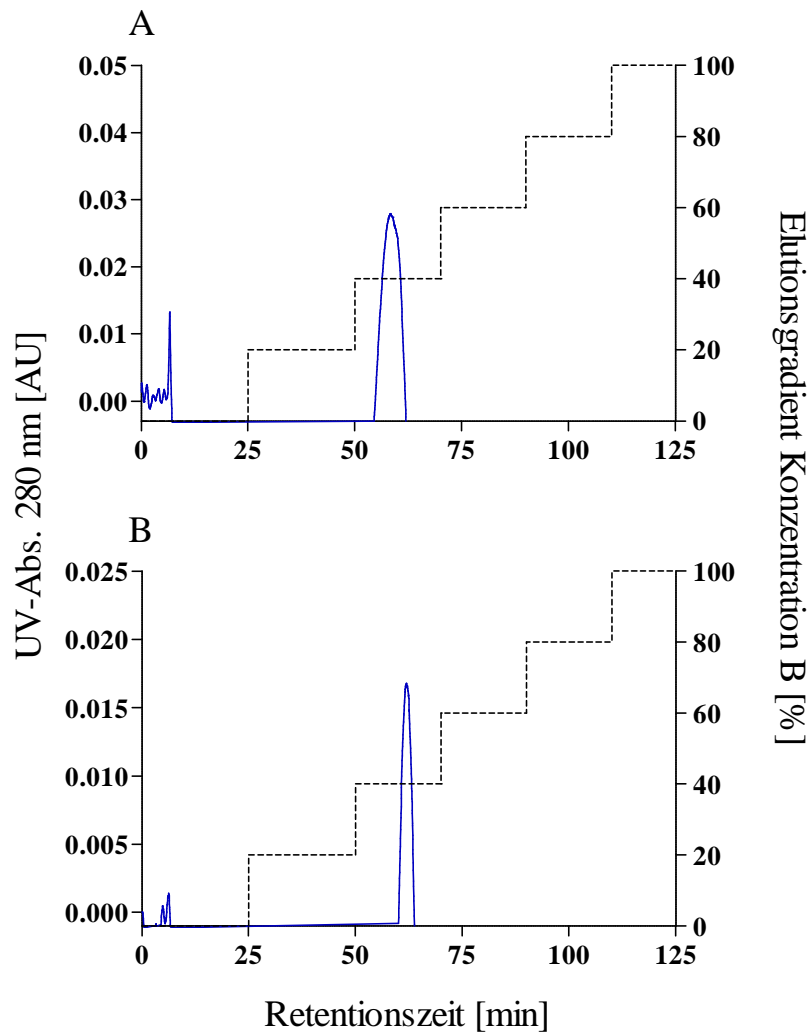


Abbildung 18: Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten vom DB der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2; **(A)** mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM KH_2PO_4 ; **(B)** mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 20 mM KH_2PO_4 ; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Elutionsgradient Konzentration B (20 mM KH_2PO_4 /1 M NaCl) (-----)

4.3.4. Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradient

Zur Abtrennung des Salzes wurde nach der Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie eine Entsalzung der Fraktionen mittels einstufigen Reversed Phase Chromatographie mit 80 % Ethanol durchgeführt. Anschließend wurde jede gewonnene Fraktion mittels Lineargradienten fraktioniert. Die Chromatogramme zeigten jeweils unterschiedliche UV-Absorptionsprofile, je nach Fraktion und Lösungsmittel. Die **Abbildung 19** zeigt zwei beispielhafte Reversed Phase Chromatogramme mit Lineargradienten der 60 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie mit TEAA (**Abbildung 19 A**) bzw. TFA (**Abbildung 19 B**) versetzter Probe. Das in der **Abbildung 19 A** dargestellte Chromatogramm zeigt drei kleine und einen dominanten

Peak (pfeilmarkiert). Dieser eluiert von der 40. bis zur 43. Minute und wurde anschließend massenspektrometrisch bestimmt. Das Chromatogramm derselben Fraktion mit TFA versetzter Probe (**Abbildung 19 B**) zeigt ein anderes UV-Adsorptionsprofil. Der intensivste Peak eluiert von der 66. bis zur 67. Minute (pfeilmarkiert) und es sind mehrere, kleinere basisliniengetrennte Peaks zu erkennen. Beide Chromatogramme zeigen eine gute Auftrennung mit scharfen, basisliniengetrennten Peaks. Alle Fraktionen wurden kontinuierlich gesammelt und der Peak mit der jeweils höchsten UV-Absorption je Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradient wurde massenspektrometrisch analysiert und identifiziert.

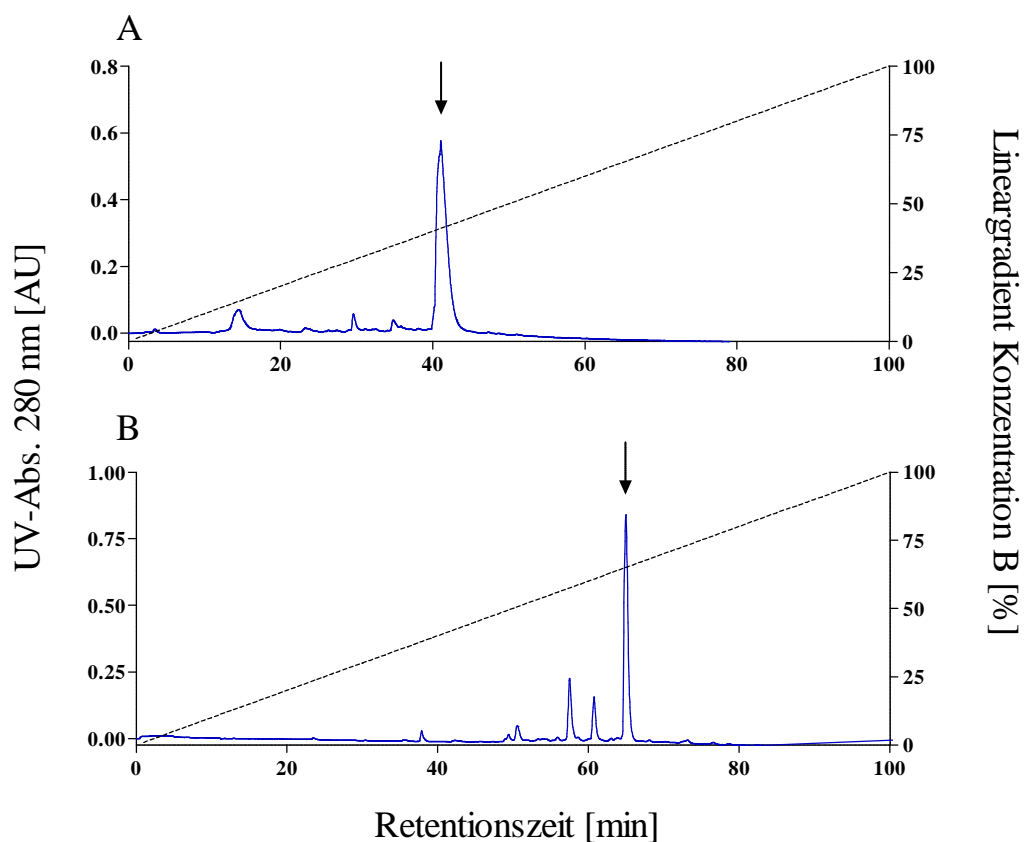


Abbildung 19: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 60 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2; (**A**) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; (**B**) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Lineargradient Konzentration B (80 % Ethanol) (-----)

In der **Abbildung 20** ist ein beispielhaftes Reversed Phase Chromatogramm mit Lineargradienten der 40 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie einmal mit TEAA (**Abbildung 20 A**) und mit TFA (**Abbildung 20 B**) versetzter Probe dargestellt. Der Pfeil markiert die Fraktion mit der höchsten UV-Absorption. Dieser intensive Peak eluiert in der **Abbildung 20 A** in einem Zeitraum von der 14. bis zur 17. Minute und in der **Abbildung 20 B** von der 29. bis zur 30 Minute und wurde anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Des Weiteren sind mehrere, kleinere, basisliniengetrennte Peaks zu erkennen, welche asserviert, aber zur Identifizierung nicht herangezogen wurden.

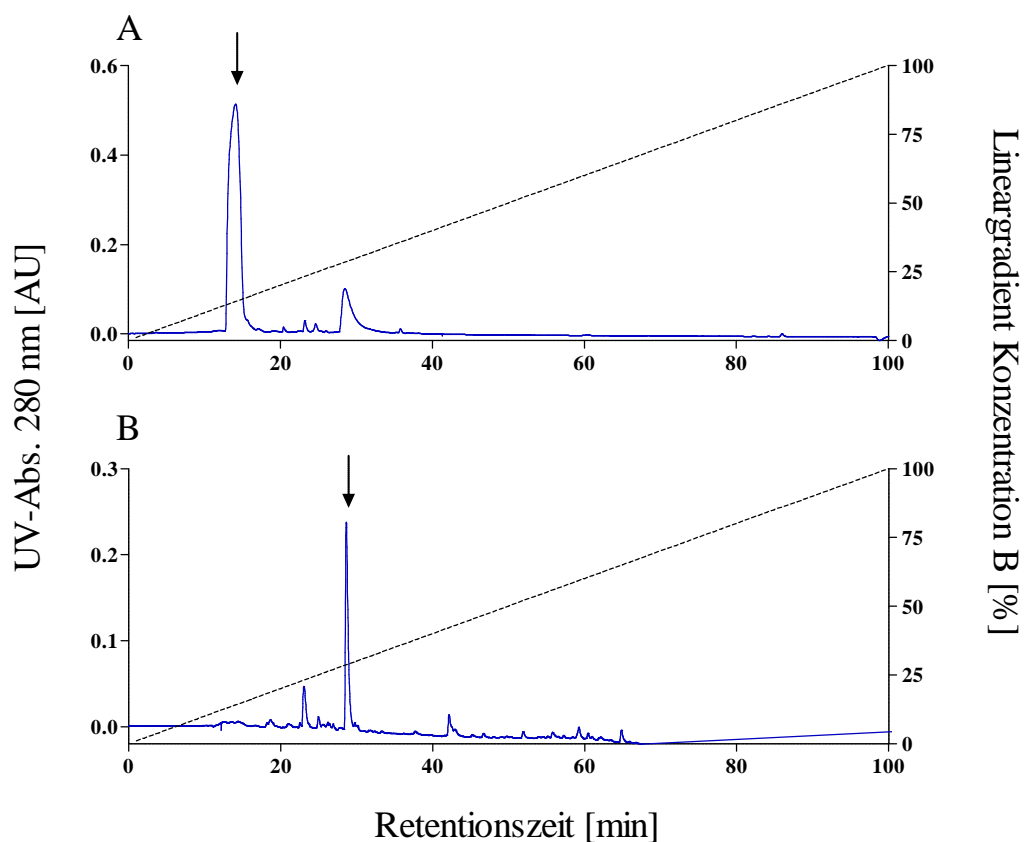


Abbildung 20: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 40 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2; (**A**) mit 40 mM TEAA versetzter Probe, Eluent A: 40 mM TEAA; (**B**) mit 0,1 % TFA versetzter Probe, Eluent A: 0,1 % TFA; Kurvenlegende: UV-Absorption 280 nm (—), Lineargradient Konzentration B (80 % Ethanol) (-----)

4.3.5. Analytische Reversed Phase Chromatographie

Nach der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten wurde eine analytische Reversed Phase Chromatographie von der Fraktion mit dem intensivsten UV-Absorptionspeak durchgeführt. Ein beispielhaftes Chromatogramm der in **Abbildung 19 B** mit dem Pfeil markierten Fraktion der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten ist in **Abbildung 21** dargestellt. Mittels der analytischen Reversed Phase Chromatographie konnten die Salzurückstände entfernt und zu einem Peak aufkonzentriert werden. Dieser ist mit einem Pfeil markiert.

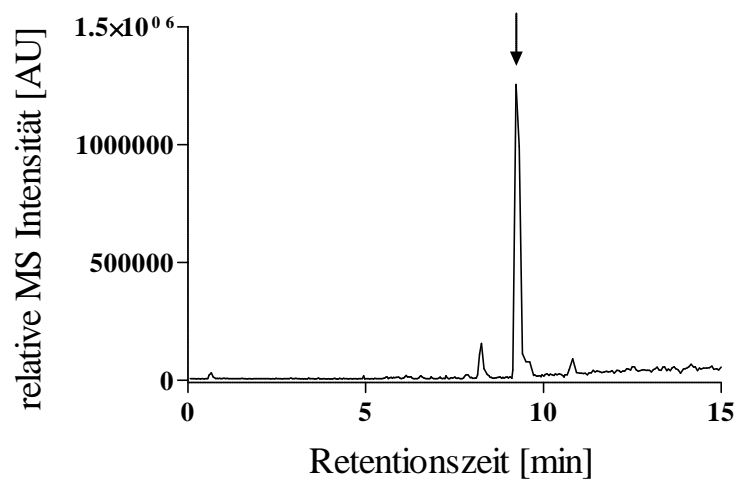


Abbildung 21: Analytische Reversed Phase Chromatographie des intensivsten UV-Absorptionspeaks der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten von der 60 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2

4.3.6. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Der Peak mit der intensivsten UV-Absorption in der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradient wurde mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie analysiert. Die **Abbildung 22** zeigt das ESI-Massenspektrum von der pfeilmarkierten Fraktion aus der **Abbildung 21**. Zur quantitativen Identifizierung der unbekannt Substanzen wurde anschließend eine datenbankgestützte Onlinesuche mit MassBank und Mascot durchgeführt.

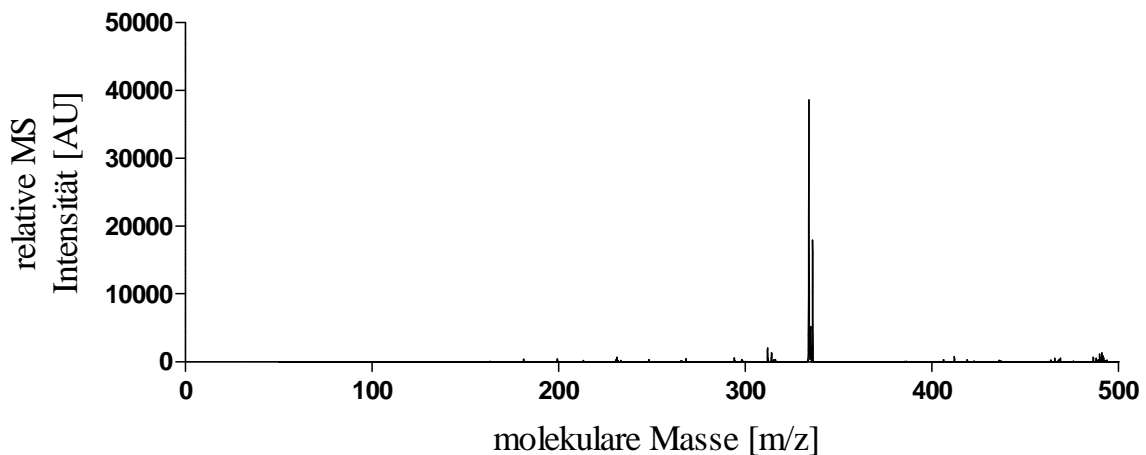


Abbildung 22: ESI-Massenspektrum der zuvor pfeilmarkierten Fraktion der analytischen Reversed Phase Chromatographie

4.3.7. Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit MassBank

Die massenspektrometrisch gemessenen Stoffe wurden mit Hilfe der Datenbank MassBank identifiziert. Die Suche wurde mit folgenden Suchkriterien durchgeführt: Spektrumsuche, Toleranz der m/z von 0,3 Units, Instrumententyp: ESI, MS-Typ: alle und Ionenmodus: positiv.

In der **Abbildung 23** ist das von der Datenbank MassBank bekannte ESI-Massenspektrum (unten, oranger Bereich) mit dem von uns gemessenen ESI-Massenspektrum (oben, grüner Bereich) vergleichend dargestellt. Alle übereinstimmenden Massenpeaks sind farbig hervorgehoben und ihre Massenzahl ist beziffert. Aufgrund des sehr ähnlichen Massenspektrums und des von der Datenbank errechneten Scores von 0,80 handelt es sich bei der zu untersuchenden Substanz sehr wahrscheinlich um den therapeutischen Metabolit Biperiden.

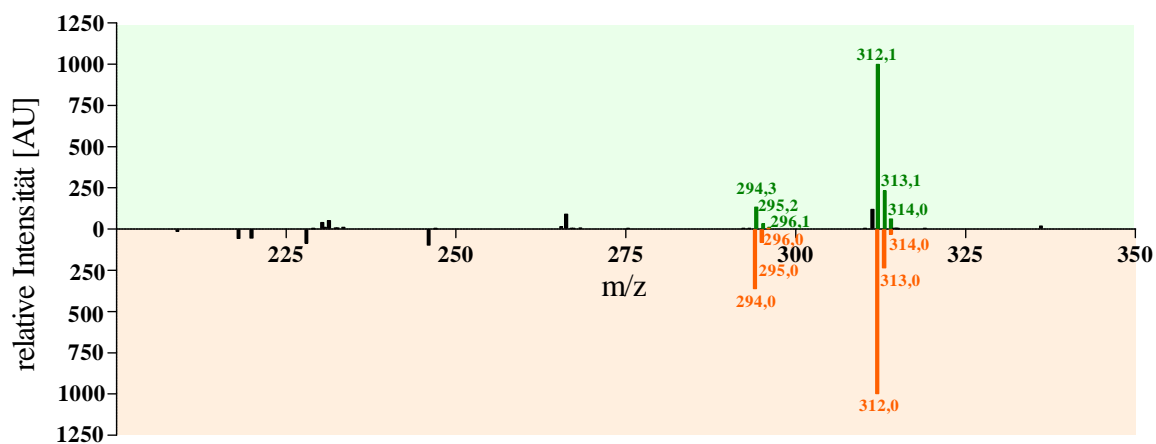


Abbildung 23: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des therapeutischen Metaboliten Biperiden

Die **Tabelle 9** zeigt alle mit Hilfe der Datenbank MassBank identifizierten Substanzen. Alle in der Tabelle aufgeführten Substanzen haben mindestens einen Scorewert von 0,6 und sind somit laut Datenbank MassBank signifikant [101]. Auf diese Weise konnten 35 Substanzen identifiziert werden. Dabei konnten 14 Substanzen den therapeutischen Metaboliten im Sinne von Medikamenten und drei Urämietoxine zugeordnet werden. Bei den Urämietoxinen handelt es sich um das wasserlösliche Urämietoxin Kreatinin sowie die proteingebundenen Urämietoxine Indolessigsäure und Spermin.

Tabelle 9: Alle Substanzen aus den Eluaten des Adsorbers 2 die mittels der Datenbank MassBank als signifikant identifiziert wurden

Substanznamen	MW	Stoffgruppe
Aminocyclopropancarbonsäure	101,05	Alphaaminosäure
2'-Desoxyadenosin	251,1	Nukleosidderivat
2-Octyl-3(2H)-Isothiazolon	213,12	Antimikrobiell
3-(5-Acetyl-2-Furyl)-5-Methoxy-2-Benzofuran-1(3H)-on	272,07	Furan
3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	238,08	aromat. Ester vom Piper longum
3',5'-Cyclic AMP	329,05	Adenosinmonophosphat
4-Methylumbelliferyl-Glucuronid	352,08	Glykosid
5'-Desoxyadenosin	251,1	Nukleosidderivat
5-Aminolävulinsäure	131,06	Aminosäure
5-Hydroxyindolylessigsäure	191,06	Serotoninmetabolit
6,7-Dimethoxy-4-Methylkumarin	220,07	Kumarinderivat
Argininethylester	202,14	Aminosäure
Biperiden	311,22	therapeutischer Metabolit
Bumetanid	364,11	therapeutischer Metabolit
Captopril	217,08	therapeutischer Metabolit

Ergebnisse

Chlorprothixen	315,08	therapeutischer Metabolit
Cyclohexylamin	99,1	Amin
Diclofenac	295,02	therapeutischer Metabolit
Diltiazem	414,16	therapeutischer Metabolit
Flecainid	414,14	therapeutischer Metabolit
Indolessigsäure	205,07	Urämietoxin
Kreatinin	113,06	Urämietoxin
L-Tryptophan	204,09	Aminosäure
Medifoxamin	257,14	therapeutischer Metabolit
Meprobamat	218,13	therapeutischer Metabolit
Methylenblau	284,12	Phenothiazinderivat
Modafinilsäure	274,07	therapeutischer Metabolit
Naringenin	272,07	Flavonoid
N-Butylbenzenesulfonamid	213,08	Weichmacher
Noramidopyrin	217,12	therapeutischer Metabolit
p-Chlorodisopyramid	373,19	therapeutischer Metabolit
Resveratrol	228,08	Polyphenol
Spermin	202,22	Urämietoxin
Streptomycin	581,13	therapeutischer Metabolit
Timolol	316,16	therapeutischer Metabolit

4.3.8. Identifizierung der Substanzen aus den ESI-Massenspektren mit Mascot

Zur Identifizierung der massenspektrometrisch gemessenen Fraktionen wurde die Datenbank Mascot verwendet. Es wurden hierbei folgende Suchkriterien verwendet: Type of search: MS/MS Ion Search, Database: NCBI nr, Enzyme: no cleave, Taxonomy: Homo sapiens (human), Mass values: Monoisotopic, Peptide Mass Tolerance: ± 0.5 Da, Fragment Mass Tolerance: ± 0.3 Da, Instrument type: ESI-TRAP. Mit der datenbankgestützten Suche konnten keine weiteren signifikanten Substanzen identifiziert werden.

5. Diskussion

5.1. Allgemein

Im Zuge des demographischen Wandels und der verbesserten Diagnostik in der Medizin steigt sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz in den letzten Jahrzehnten weltweit an [9]. Im fortgeschrittenen Stadium der chronischen Niereninsuffizienz wird zur Behandlung in Deutschland vor allem die Hämodialyse eingesetzt [12]. Studien haben jedoch gezeigt, dass mittels der konventionellen Hämodialyse proteingebundene Urämietoxine sowie Mittelmoleküle nur in unzureichendem Maße aus dem Patientenblut eliminiert werden können [34]. Dies liegt an den besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften der Urämietoxine. So liegen proteingebundene Urämietoxine im Organismus zu großen Teilen an Plasmaproteine gebunden vor und können mittels Diffusion, dem zugrunde liegenden physikalischen Prinzip der konventionellen Dialyse, nicht ausreichend aus dem Patientenblut entfernt werden [41]. Auch aufgrund der beschränkten Porengröße der semipermeablen Membran gestaltet sich die Entfernung vieler Mittelmoleküle schwierig. Somit verbleiben nach einer konventionellen Dialysebehandlung vermehrt proteingebundene Urämietoxine und Mittelmoleküle im Blut [54, 88]. Viele Stoffe der Urämietoxine stehen unter dem Verdacht, toxische Potentiale zu entfalten und neben den bekannten Risikofaktoren an der erhöhten kardiologischen Morbidität und Mortalität der chronisch nierenerkrankten Patienten beizutragen [59, 80-82]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es unabdingbar, neue Dialyseverfahren zu entwickeln und zu etablieren. Eine neue Möglichkeit stellen eventuell die adsorptiven Verfahren dar. Diese Verfahren wurden ursprünglich für die Behandlung des akuten Leberversagens entwickelt. Dabei kommen zwei Arten von Adsorbentien zum Einsatz, die aufgrund ihres Oberflächenmaterials besonders hydrophobe bzw. geladene Substanzen binden können.

Zur Evaluierung der Abtrennleistung der Adsorbentien wurde eine Pilotstudie mit einem modifizierten extrakorporalen, adsorptiven Verfahren von Fresenius, dem Prometheus[®]-System, an fünf chronisch niereninsuffizienten Patienten durchgeführt [90]. Hier konnte gezeigt werden, dass die drei exemplarisch bestimmten proteingebundenen Urämietoxine Phenyllessigsäure, p-Kresylsulfat und Indoxylsulfat im Vergleich zur konventionellen Hämodialyse signifikant besser aus dem Patientenblut eliminiert werden können. Dabei hat der FPSA-Kreislauf, im Gegensatz zum nachgeschalteten Hämodialysekreislauf, einen deutlichen Einfluss auf die Abtrennrate der proteingebundenen Urämietoxine. Somit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von

Adsorbern, im Vergleich zur konventionellen Hämodialyse, vermehrt proteingebundene Toxine aus dem Patientenblut entfernt werden konnten. In dieser Studie wurden jedoch nur drei exemplarische proteingebundene Urämietoxine bestimmt. Dementsprechend stellt sich die Frage, welche weiteren Substanzen an den Adsorbern binden? Können mit ihrem Einsatz weitere Urämietoxine oder sogar bisher noch unbekannte Urämietoxine eliminiert werden? Oder binden eventuell auch andere Mediatoren bzw. Metabolite an den Adsorbern?

5.2. Chromatographische Analyse mittels Stufengradienten

Von den Adsorbern wurden die retendierten Substanzen eluiert und mittels chromatographischer Verfahren aufgereinigt und isoliert. Hierbei wurden die Eluate beider Adsorber zunächst mittels einer Reversed Phase Chromatographie und anschließender Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie mit einem Fünfstufen-Gradienten aufgetrennt. Zwischen den einzelnen Adsorbern lassen sich bereits in der chromatographischen Auftrennung Unterschiede bezüglich der Konzentration und Zusammensetzung der Adsorbereluate feststellen.

Vergleicht man die entstandenen Peakflächen der einzelnen Fraktionen der Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie beider Adsorber, fällt auf, dass die Peakfläche des Adsorbers 1 größer ist. Dabei stellt die Peakfläche ein Maß für die quantitative Analyse von Substanzen dar. Tendenziell kann davon ausgegangen werden, dass mehr Substanzen am Adsorber 1 retendieren, als am Adsorber 2.

Des Weiteren zeigen die Adsorbereluate in den Chromatogrammen unterschiedliche Retentionszeiten. Beispielsweise eluieren in der Kationenaustausch-Chromatographie des Adsorbers 1 der Großteil der Substanzen im Durchbruch (**Abbildung 9**), während beim Adsorber 2 der höchste UV-Absorptionspeak in der 40 %-Fraktion zu bestimmen ist (**Abbildung 18**). Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten ist bereits in der chromatographischen Auftrennung davon auszugehen, dass die Adsorbereluate unterschiedliche Substanzen beinhalten.

Diese chromatographische Vermutung ließ sich in der späteren massenspektrometrischen Analyse bestätigen. Insgesamt konnten 83 unterschiedliche Substanzen identifiziert werden, von denen nur sechs Substanzen an beiden Adsorbern retendierten. Die restlichen Substanzen gingen entweder eine Bindung mit dem Adsorber 1 oder 2 ein. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Eliminierung von Substanzen aus dem Patientenblut durch den Adsorber 1, dem 54 Stoffe

zugeordnet werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden nur 35 Stoffe aus dem Eluat des Adsorbers 2 identifiziert.

Eine Aussage bezüglich der Ursachen für die vermehrte Bindung an dem hydrophoben Adsorber 1 zu treffen, erweist sich jedoch aufgrund der zur Zeit verfügbaren Daten als limitiert. Da einerseits nur ein kleiner Teil aller in Frage kommender Peaks des Lineargradienten analysiert und identifiziert wurden und andererseits die identifizierten Substanzen ein sehr heterogenes Substanzgemisch darstellen. Bei beiden Adsorbentern wurden therapeutische Metabolite identifiziert, die in ihrer Pharmakokinetik sehr unterschiedlich sind, sodass eine vermehrte Abtrennung allein aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften als unwahrscheinlich anzusehen ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die vermehrte Bindung am Adsorber 1 könnten die Montagegegebenheiten des FPSA-Kreislaufs sein. Dieser ist als erste „Reinigungsstation“ nach dem AlbuFlow eingebaut. Erst im Anschluss daran durchströmt das Patientenblut den Adsorber 2 und anschließend den normalen Dialysekreislauf. Ob eine Änderung der Einbaumodalitäten eine veränderte Abtrennung ausmacht, müsste in weiteren Experimenten mit verändertem Versuchsaufbau untersucht werden.

5.3. Chromatographische Analyse mittels Lineargradienten

Im Anschluss an die Auftrennung der Adsorbereluate mittels Stufengradienten schloss sich eine Reversed Phase Chromatographie jeder aufgetrennten Fraktion mittels Lineargradienten an. Die zuvor beschriebenen Unterschiede zwischen den Chromatogrammen der beiden Adsorber fanden sich ebenfalls in der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten. Auch hier zeigten die Chromatogramme des ersten Adsorber eine größere Peakfläche bzw. intensivere Peaks. Zudem unterschieden sich die Retentionszeiten der einzelnen Fraktionen im Vergleich der beiden Adsorber zueinander. Somit lässt sich die Aussage einer vermehrten Abtrennung des Adsorbers 1 und unterschiedlichen Substanzretention der beiden Adsorbereluate ebenfalls beschreiben.

Des Weiteren trug die Wahl der Lösungsmittel zur Maskierung der positiven bzw. negativen Ladungen innerhalb der chromatographischen Aufarbeitung zu einer differenzierteren Trennung des Substanzgemisches bei. Diese unterschiedliche Auftrennung lässt sich vor allem in der Reversed Phase Chromatographie mittels Lineargradienten gut erkennen. Vergleicht man die beiden Chromatogramme einer Fraktion eines Adsorbers miteinander, lassen sich neben den unterschiedlichen Retentionszeiten auch verschiedene Peakhöhen beschreiben. Diese

unterschiedliche Verteilung kommt ebenfalls durch die Heterogenität des Substanzgemisches zustande und gibt einen Hinweis auf die Vielfältigkeit der an den Adsorbern retendierten Substanzen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten aufgrund dieser Fülle nicht sämtliche Peaks der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten analysiert werden. Somit wurde für die massenspektrometrische Messung für jede einzelne Fraktion jedes Adsorbers der jeweils intensivste und am besten differenzierte Peak der Reversed Phase Chromatographie bestimmt und anschließend analysiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur Peaks mit einer guten Auflösung und einer entsprechend hohen Konzentration massenspektrometrisch analysiert werden. Diese gute Qualität ist Voraussetzung für eine eindeutige Analysierung und Identifizierung der unbekannt Substanzen mittels massenspektrometrischer Verfahren.

Die Dissertation gibt somit insgesamt einen Einblick über die Fülle der an den Adsorbern retendierten Substanzen und auch über das Verteilungsmuster der identifizierten Substanzen zu den einzelnen Fraktionen der beiden Adsorber. Um eine differenziertere Aussage bezüglich aller an den Adsorbern retendierten Substanzen treffen zu können, sind weitere massenspektrometrische Messungen der nicht analysierten Peaks notwendig. Diese Auswertung ist Bestandteil weiterführender Forschung.

5.4. Identifizierung der an den Adsorbern gebundenen Substanzen

Im Anschluss an die chromatographische Auftrennung mittels Stufen- und Lineargradienten wurden die einzelnen Proben massenspektrometrisch analysiert und anschließend mittels der Datenbank MassBank identifiziert. Diese Datenbank berücksichtigt in der Auswertung neben der molekularen Masse auch die Übereinstimmung der einzelnen Massenspektren und gibt diese wieder. Dadurch ist eine differenziertere Auswertung möglich, da neben der reinen Massenübereinstimmung die Spektren mit einbezogen werden. Diesen Vorteil sieht man z.B. bei der identifizierten Substanz Metoprolol gut. Hierbei liegt der rein rechnerisch ermittelte Score bei 0,73 und ist somit signifikant. Schaut man sich jedoch dazu das Massenspektrum an, ist aufgrund der vielen übereinstimmenden Peaks und des ähnlichen Massenspektrums stark davon auszugehen, dass es sich bei der gefundenen Substanz um das Medikament Metoprolol handelt (siehe **Abbildung 15**). Auf diese Weise konnten alle identifizierten Stoffe auch auf Spektrumsebene miteinander verglichen werden.

Mit Hilfe der datenbankgestützten Auswertung konnte gezeigt werden, dass an den Adsorbern eine Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen retendieren (siehe **Tabelle 8** und **Tabelle 9**).

Insgesamt wurden 82 unterschiedliche Substanzen mit der Datenbank MassBank identifiziert. Dabei konnten 53 Substanzen dem hydrophoben Adsorber 1 und 35 Substanzen dem Anionenaustauscher Adsorber 2 zugeordnet werden. Sechs der identifizierten Substanzen wurden sowohl vom Adsorber 1 als auch Adsorber 2 retendiert. Neben den in der Pilotstudie nachgewiesenen Urämietoxine Phenyllessigsäure, p-Kresylsulfat und Indoxylsulfat konnten vier weitere Urämietoxine identifiziert werden: Das wasserlösliche Urämietoxine Kreatinin sowie die proteingebundenen Urämietoxine Indolessigsäure, Kynurenin und Spermin. Mittels der Datenbanksuche mit Mascot konnte ein weiteres Urämietoxin, das Mittelmolekül Interleukin-6, identifiziert werden. Die geringe Anzahl an identifizierten Urämietoxinen bzw. der fehlende Nachweis der Urämietoxine aus der Pilotstudie führen wir auf die begrenzte Menge an ausgewerteten Proben zurück. Die für diese Dissertation analysierten Proben machen ca. 10 % von allen aufgereinigten Eluat aus. Die limitierte Auswertung ist der aufwendigen Reinigung und Isolierung der Adsorbereluate geschuldet.

Neben den Urämietoxinen retendieren vor allem therapeutische Metabolite an den Adsorbern. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei 39 Substanzen um therapeutische Metabolite im Sinne von Medikamenten handelt. Ein Beispiel dafür zeigen die **Abbildung 15** und **Abbildung 23**, bei denen mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass es sich um Metoprolol und Biperiden handelt. Biperiden ist ein Medikament, das zur Behandlung vom Morbus Parkinson eingesetzt wird. Bei Metoprolol handelt es sich um ein Antihypertensivum, welches zur Klasse der Betablocker gehört. Die Erkenntnis, dass an den Adsorbern auch therapeutische Metabolite retendieren, ist für den geplanten Einsatz in der Dialyse niereninsuffizienter Patienten sehr wichtig.

Schaut man zurück in die Entwicklung der adsorptiven Verfahren und in ihr derzeitiges Einsatzgebiet, ist es nicht verwunderlich, dass es neben der Abtrennung von Urämietoxinen auch zur Eliminierung von therapeutischen Metaboliten kommt. Die extrakorporalen Adsorberverfahren MARS[®] und Prometheus[®] werden heutzutage erfolgreich beim akuten Leberversagen eingesetzt. Viele Schadstoffe weisen eine hohe Affinität zum Adsorbermaterial auf und können somit aus dem Patientenblut eliminiert werden. Eine Indikation stellt beispielsweise die Intoxikation mit Medikamenten oder Drogen dar, die zu einem akutem Leberversagen, führen können [102, 103]. Dabei wird der Effekt der vermehrten Eliminierung der therapeutischen Metabolite genutzt, um die Entgiftungsfunktion der Leber zu unterstützen.

Inwiefern durch diesen Effekt der Einsatz der adsorptiven Verfahren bei chronisch niereninsuffizienten Patienten beeinflusst wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer einzuschätzen. Dass die vermehrte Abtrennung eine Limitation im Einsatz der adsorptiven Verfahren zur Dialysebehandlung darstellen könnte bzw. eine angepasste Dosierung und Gabe von Medikamenten nötig macht, lässt sich jedoch heute schon vermuten.

Möglicherweise könnte man diesen Effekt auch nutzen und das Adsorberverfahren bei akuter Medikamentenüberdosierung oder Medikamentenakkumulation, durch die verringerte Ausscheidung der erkrankten Niere, anwenden. Ob mit diesem Verfahren die Detoxikation von Schadstoffen ebenfalls eine Indikation zur Behandlung bei nierenerkrankten Patienten darstellt, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Die **Tabelle 8** und **Tabelle 9** geben alle identifizierten Substanzen wieder. Hierbei handelt es sich um eine qualitative Analyse der Substanzen, ohne Berücksichtigung der Menge an Substanz. Um eine genaue Aussage zur therapeutischen Konsequenz treffen zu können, muss eine quantitative Bestimmung im Anschluss an diese Dissertation erfolgen.

Des Weiteren zeigte sich, dass am Adsorber 1 eine höhere Anzahl von Substanzen retendieren und mehr Stoffe identifiziert werden konnten. Ob dies auf einen zufälligen Effekt aufgrund der Einbauposition im verwendeten Gerät oder aufgrund der begrenzten Auswertung zurückzuführen ist, lässt sich nur mit der Durchführung weiterer Experimente bzw. weiteren Identifizierungen der noch nicht berücksichtigten Peaks beantworten. Die vermehrte Abtrennung kann jedoch auch in der Oberflächenbeschaffenheit des Adsorbermaterials begründet liegen. Viele der Urämietoxine und identifizierten Substanzen zeigen einen hydrophoben Charakter und gehen daher vermehrt die Bindung mit dem hydrophoben Adsorber ein. Somit kann bezüglich des Abtrennpotentials der beiden Adsorber keine signifikante Aussage getroffen werden.

Von den insgesamt 83 Substanzen wurden sechs Substanzen (5-Hydroxyindolylessigsäure, Diltiazem, Indolessigsäure, L-Thryptophan, Modafinilsäure und p-Chlorodisopyramid) in den Eluatn beider Adsorber identifiziert. Dies zeigt, dass einige Substanzen an beiden Adsorbern retendieren. Dieser Effekt wurde bereits in der Pilotstudie beschrieben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass neben der deutlich vermehrten Abtrennrage von Phenyllessigsäure, p-Kresylsulfat und Indoxylsulfat eine große Anzahl weiterer Substanzen an den Adsorbermaterialien retendieren. Unter diesen Substanzen finden sich zahlreiche Stoffgruppen bzw. Metabolite. Dazu zählen auch die Urämietoxine. Die Mehrzahl der retendierten Substanzen stellen jedoch die therapeutischen Metabolite dar. Inwieweit dieses Ergebnis eine klinische Konsequenz im Sinne einer veränderten Dosierung bzw. angepassten Medikamentengabe, z.B. nach der Dialyse bedeutet, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig beantworten. Für diese Fragestellung sind weitere Untersuchungen sowie die quantitative Bestimmung der therapeutischen Metabolite notwendig, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2 ed. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 437-457.
2. Thews, G. and P. Vaupel, *Vegetative Physiologie*. 5 ed. 2005, Berlin: Springer-Verlag. 433-492.
3. Netter, F.H., *Innere Medizin*. 1 ed. 2000, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 338-497.
4. Herold, G., *Innere Medizin*. 2011, Köln: Eigenverlag. 617-30.
5. Kuhlmann, U., et al., *Nephrologie Pathophysiologie-Klinik-Nierenersatzverfahren*. 5 ed. 2008, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 308-411.
6. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
7. Hoberg, E., et al., *Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen*. Herzmedizin, 2007. **24**: p. 136-146.
8. *KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl., 2013. **3**: p. 1-150.
9. Vilayur, E. and D.C. Harris, *Emerging therapies for chronic kidney disease: what is their role?* Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(7): p. 375-83.
10. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease in the United States*. JAMA, 2007. **298**(17): p. 2038-47.
11. Bethesda, M., *USRDS 2006 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.
12. Frei, U. and H.-J. Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland-Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland*. QuaSi-Niere, 2006/2007: p. 5-38.
13. *Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den gemeinsamen Bundesausschuss, Berichtjahr 2013*. Medical Netcare GmbH, 2014. (Accessed November 6, 2014 at www.medical-netcare.de/qsd.php)
14. diabetesDE, *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2012*. Diabetes-Journal, 2012.
15. Sprangers, B., P. Evenepoel and Y. Vanrenterghem, *Late referral of patients with chronic kidney disease: no time to waste*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1487-94.
16. Cockcroft, D. and M. Gault, *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron, 1976. **16**: p. 31-41.

17. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. *Kidney Int*, 2005. **67**(6): p. 2089-100.
18. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. *Ann Intern Med*, 1999. **130**(6): p. 461-70.
19. Astor, B.C., et al., *Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts*. *Kidney Int*, 2011. **79**(12): p. 1331-40.
20. Gansevoort, R.T., et al., *Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts*. *Kidney Int*, 2011. **80**(1): p. 93-104.
21. Matsushita, K., et al., *Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis*. *Lancet*, 2010. **375**(9731): p. 2073-81.
22. van der Velde, M., et al., *Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts*. *Kidney Int*, 2011. **79**(12): p. 1341-52.
23. Collins, A.J., et al., *US Renal Data System 2013 Annual Data Report*. *Am J Kidney Dis*, 2014. **63**(1 Suppl): p. A7.
24. *NTX-Nierentransplantation Qualitätsindikatoren, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2013*. AQUA-Institut GmbH, 2014. (Accessed May 7, 2014 at www.sqg.de/ergebnisse/leistungsbereiche/nierentransplantation.html)
25. GUIDELINES, N.K.D., *Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations, 2006 Updates, Hemodialysis Adequacy, Peritoneal Dialysis Adequacy, Vascular Access*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2006. **48**.
26. Tattersall, J., L. Pedrini and A. Martin-Malo, *When to start dialysis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2002. **17**: p. 10.
27. Hörl, W.H. and C. Wanner, *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis*. 6. ed. 2004, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
28. Daugirdas, J., P. Blake and T. Ing, *Handbook of dialysis*. 4 ed. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams and Wilkins.
29. Böhler, J. and K. Fischer, *Antikoagulation bei extrakorporalen Therapieverfahren*. 2003.
30. Eloit, S., I. Ledebro and R.A. Ward, *Extracorporeal removal of uremic toxins: can we still do better?* *Semin Nephrol*, 2014. **34**(2): p. 209-27.

31. Vanholder, R., G. Glorieux and N. Lameire, *New insights in uremic toxicity*. Contrib Nephrol, 2005. **149**: p. 315-24.
32. Tast, C. and T. Mettang, *Peritonealdialyse: Klinischer Leitfaden für Pflegekräfte*. 4 ed. 2013, Bern: Hans Huber Verlag. 15-45.
33. Lysaght, M.J., et al., *The influence of dialysis treatment modality on the decline of remaining renal function*. ASAIO Trans, 1991. **37**(4): p. 598-604.
34. Dhondt, A., et al., *The removal of uremic toxins*. Kidney Int Suppl, 2000. **76**: p. S47-59.
35. Neiryneck, N., et al., *An update on uremic toxins*. Int Urol Nephrol, 2013. **45**(1): p. 139-50.
36. Vanholder, R. and R. De Smet, *Pathophysiologic effects of uremic retention solutes*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(8): p. 1815-23.
37. Vanholder, R., et al., *Uremic toxicity: present state of the art*. Int J Artif Organs, 2001. **24**(10): p. 695-725.
38. Vanholder, R., et al., *Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1934-43.
39. Duranton, F., et al., *Normal and pathologic concentrations of uremic toxins*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(7): p. 1258-70.
40. Vanholder, R., S. Van Laecke and G. Glorieux, *The middle-molecule hypothesis 30 years after: lost and rediscovered in the universe of uremic toxicity?* J Nephrol, 2008. **21**(2): p. 146-60.
41. Jourde-Chiche, N., et al., *Protein-bound toxins--update 2009*. Semin Dial, 2009. **22**(4): p. 334-9.
42. Vanholder, R., S. Van Laecke and G. Glorieux, *What is new in uremic toxicity?* Pediatr Nephrol, 2008. **23**(8): p. 1211-21.
43. Vanholder, R., et al., *Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(6): p. 1048-56.
44. Van Biesen, W., et al., *The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years*. Eur Heart J, 2007. **28**(4): p. 478-83.
45. D'Hooge, R., et al., *Convulsive action and toxicity of uremic guanidino compounds: behavioral assessment and relation to brain concentration in adult mice*. J Neurol Sci, 1992. **112**(1-2): p. 96-105.
46. D'Hooge, R., et al., *Involvement of voltage- and ligand-gated Ca²⁺ channels in the neuroexcitatory and synergistic effects of putative uremic neurotoxins*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1764-75.

47. Schepers, E., et al., *Guanidino compounds as cause of cardiovascular damage in chronic kidney disease: an in vitro evaluation*. Blood Purif, 2010. **30**(4): p. 277-87.
48. Glorieux, G.L., et al., *In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2184-92.
49. Leiper, J. and P. Vallance, *Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 542-8.
50. Zoccali, C., et al., *Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(2): p. 490-6.
51. Bode-Boger, S.M., et al., *Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1128-34.
52. Schepers, E., et al., *Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(5): p. 1429-35.
53. Vanholder, R., et al., *Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1464-7.
54. Martinez, A.W., et al., *Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3430-6.
55. de Loor, H., et al., *Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum*. Clin Chem, 2005. **51**(8): p. 1535-8.
56. Schepers, E., et al., *P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(2): p. 592-6.
57. Meert, N., et al., *Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(6): p. 2388-96.
58. Meijers, B.K., et al., *The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(5): p. 891-901.
59. Wu, I.W., et al., *p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 938-47.
60. Chiu, C.A., et al., *Increased levels of total P-Cresylsulphate and indoxyl sulphate are associated with coronary artery disease in patients with diabetic nephropathy*. Rev Diabet Stud, 2010. **7**(4): p. 275-84.
61. Wang, C.P., et al., *Serum levels of total p-cresylsulphate are associated with angiographic coronary atherosclerosis severity in stable angina patients with early stage of renal failure*. Atherosclerosis, 2010. **211**(2): p. 579-83.

62. Liabeuf, S., et al., *Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(4): p. 1183-91.
63. Wu, I.W., et al., *Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause mortality in elderly hemodialysis patients--a prospective cohort study*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(3): p. 1169-75.
64. Motojima, M., et al., *Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1671-80.
65. Yu, M., Y.J. Kim and D.H. Kang, *Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(1): p. 30-9.
66. Yamamoto, H., et al., *Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells*. Kidney Int, 2006. **69**(10): p. 1780-5.
67. Niwa, T. and M. Ise, *Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis*. J Lab Clin Med, 1994. **124**(1): p. 96-104.
68. Niwa, T., M. Ise and T. Miyazaki, *Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate*. Am J Nephrol, 1994. **14**(3): p. 207-12.
69. Barreto, F.C., et al., *Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(10): p. 1551-8.
70. Cheung, A.K., et al., *Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 546-55.
71. Liabeuf, S., et al., *Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients*. Kidney Int, 2012. **82**(12): p. 1297-303.
72. Danesh, F. and L.T. Ho, *Dialysis-related amyloidosis: history and clinical manifestations*. Semin Dial, 2001. **14**(2): p. 80-5.
73. Hasuike, Y., et al., *Interleukin-6 is a predictor of mortality in stable hemodialysis patients*. Am J Nephrol, 2009. **30**(4): p. 389-98.
74. Rao, M., et al., *Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(2): p. 324-33.
75. Tripepi, G., F. Mallamaci and C. Zoccali, *Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16 Suppl 1**: p. S83-8.
76. Kimmel, P.L., et al., *Immunologic function and survival in hemodialysis patients*. Kidney Int, 1998. **54**(1): p. 236-44.

77. Fliser, D., et al., *Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(9): p. 2600-8.
78. Gutierrez, O.M., et al., *Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease*. Circulation, 2009. **119**(19): p. 2545-52.
79. Gutierrez, O.M., et al., *Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis*. N Engl J Med, 2008. **359**(6): p. 584-92.
80. Bammens, B., et al., *Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2006. **69**(6): p. 1081-7.
81. Meijers, B.K., et al., *Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2008. **73**(10): p. 1174-80.
82. Winchester, J.F., T.H. Hostetter, and T.W. Meyer, *p-Cresol sulfate: further understanding of its cardiovascular disease potential in CKD*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(5): p. 792-4.
83. Maduell, F., et al., *Osteocalcin and myoglobin removal in on-line hemodiafiltration versus low- and high-flux hemodialysis*. Am J Kidney Dis, 2002. **40**(3): p. 582-9.
84. Meert, N., et al., *Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(2): p. 562-70.
85. Meert, N., et al., *Prospective evaluation of the change of predialysis protein-bound uremic solute concentration with postdilution online hemodiafiltration*. Artif Organs, 2010. **34**(7): p. 580-5.
86. Meert, N., et al., *Evolution of protein-bound uraemic solutes during predilution haemofiltration*. J Nephrol, 2009. **22**(3): p. 352-7.
87. Eloot, S., et al., *Impact of hemodialysis duration on the removal of uremic retention solutes*. Kidney Int, 2008. **73**(6): p. 765-70.
88. Lesaffer, G., et al., *Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(1): p. 50-7.
89. Krieter, D.H., et al., *Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(1): p. 212-8.
90. Brettschneider, F., et al., *Removal of protein-bound, hydrophobic uremic toxins by a combined fractionated plasma separation and adsorption technique*. Artif Organs, 2013. **37**(4): p. 409-16.
91. Falkenhagen, D., et al., *Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances*. Artif Organs, 1999. **23**(1): p. 81-6.

92. Christmann, H., *Prometheus-ein extrakorporales Blutreinigungsverfahren zur Leberunterstützung*. KARDIOTECHNIK, 2006. **4**: p. 108-111.
93. Lottspeich, F. and J.W. Engels, *Bioanalytik*. 3 ed. 2012, Heidelberg: Springer-Verlag. 243-424.
94. Otto, M., *Analytische Chemie*. 3ed. 2006, Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 160-534.
95. Meyer, V.R., *Praxis der Hochleistungschromatographie*. 2009, Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 4-102.
96. Henke, H., *Flüssig-Chromatographie*. 1999, Würzburg: Vogel-Verlag. 37-56.
97. Weis, J., *Ionenchromatographie*. 3 ed. 2001, Weinheim: Wiley-VCH-Verlag. 1-339.
98. Gross, J.H., *Massenspektrometrie*. 2013, Heidelberg: Springer-Verlag. 1-654.
99. Di, B., et al., *Solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the determination of pitavastatin in human plasma and urine for application to Phase I clinical pharmacokinetic studies*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **868**(1-2): p. 95-101.
100. Throck, W. and O.D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. 2007, Chichester: John Wiley. 53-228.
101. Horai, H., et al., *MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences*. J Mass Spectrom, 2010. **45**(7): p. 703-14.
102. Rifai, K., *Extracorporeal albumin dialysis*. Hepatol Res, 2008. **38 Suppl 1**: p. S41-5.
103. Stange, J., *Extracorporeal liver support*. Organogenesis, 2011. **7**(1): p. 64-73.

7. Anhang

7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz.....	5
Tabelle 2: CGA-Klassifikation nach Ursache (Causa), GFR und Albuminurie	8
Tabelle 3: Klassifikation der Urämietoxine	13
Tabelle 4: Gradienten der präparativen Reversed Phase Chromatographie.....	29
Tabelle 5: Gradienten der präparativen Anionenaustausch-Chromatographie	30
Tabelle 6: Gradienten der präparativen Kationenaustausch-Chromatographie.....	30
Tabelle 7: Analytische Reversed Phase Chromatographie für die massenspektrometrische Messung.....	32
Tabelle 8: Alle Substanzen aus den Eluaten des Adsorbers 1 die mittels der Datenbank MassBank als signifikant identifiziert wurden.....	45
Tabelle 9: Alle Substanzen aus den Eluaten des Adsorbers 2 die mittels der Datenbank MassBank als signifikant identifiziert wurden.....	57

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Renale Grunderkrankung der dialysepflichtigen Patienten.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prometheus [®] -Systems	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers.....	24
Abbildung 5: Aufreinigungsschema der Eluate des Adsorbers 1	27
Abbildung 6: Aufreinigungsschema der Eluate des Adsorbers 2.....	33
Abbildung 7: Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von den Eluaten des Adsorbers 1	36
Abbildung 8: Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von der 20 %- Fraktion der Reversed Phase Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1	38
Abbildung 9: Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten vom DB der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1	39

Abbildung 10: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 80 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1	41
Abbildung 11: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1.....	42
Abbildung 12: Analytische Reversed Phase Chromatographie des intensivsten UV-Absorptionspeaks der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten von der 20 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 1	43
Abbildung 13: ESI-Massenspektrum der zuvor pfeilmarkierten Fraktion der analytischen Reversed Phase Chromatographie.....	43
Abbildung 14: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des Urämietoxins Kynurenin	44
Abbildung 15: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des therapeutischen Metaboliten Metoprolol.....	45
Abbildung 16: Reversed Phase Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von den Eluaten des Adsorbers 2	49
Abbildung 17: Anionenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten von der 20 %-Fraktion der Reversed Phase Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2	50
Abbildung 18: Kationenaustausch-Chromatographie mit Fünfstufen-Gradienten vom DB der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2	52
Abbildung 19: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 60 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2	53
Abbildung 20: Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten der 40 %-Fraktion der Kationenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2.....	54
Abbildung 21: Analytische Reversed Phase Chromatographie des intensivsten UV-Absorptionspeaks der Reversed Phase Chromatographie mit Lineargradienten von der 60 %-Fraktion der Anionenaustausch-Chromatographie von den Eluaten des Adsorbers 2	55
Abbildung 22: ESI-Massenspektrum der zuvor pfeilmarkierten Fraktion der analytischen Reversed Phase Chromatographie.....	56

Abbildung 23: Vergleichsdarstellung des gemessenen ESI-Massenspektrums (oben, grün) mit dem bei der Datenbank MassBank bekannten ESI-Massenspektrum (unten, orange) des therapeutischen Metaboliten Biperiden 57

7.3. Geräte

Gerät	Firma
Analysewaage, AS120	OHAUS, USA
Chromolith [®] RP-18e, 4,6 x 100 mm	Merck, Deutschland
Fraction Collector, Model 2128	Bio-Rad, USA
HCT ESI MS	Bruker Daltonic, Deutschland
HPLC-Pumpe, BioLogic DuoFlow	Bio-Rad, USA
Labor-pH-Meter, inoLab pH720	WTW, Deutschland
Leitfähigkeitsmessgerät, LF 39	WTW, Deutschland
LiChroprep [®] RP C18, 310 x 25 mm	Merck, Deutschland
Präzisionswaage, Delta Range PC 440M	Mettler-Toledo GmbH, Deutschland
Probenflaschen mit Septum-Gewindeverschluss	Agilent Technologies, Deutschland
Reinstwasseranlage, Seralpur DELTA UF	ELGA LabWater, Deutschland
Reversed Phase Säule- ZORBAX, SB C18 (5µm 150*0,5mm)	Agilent, Deutschland
Schlauchpumpe, REGLO Digital ISM 834/230 V	Ismatec, Deutschland
Speed Vac, Savant SPD 1013	Thermo, USA
Superformance [®] 300-16 Säule gestopft mit YMC-BioPro Q75 (50 x 4,6 mm, 75 µm)	Merck, Deutschland
Superformance [®] 300-16 Säule gestopft mit YMC-BioPro S75 (50 x 4,6 mm, 75 µm)	Merck, Deutschland
SuperLoop (335 x 30 mm)	GE Healthcare, UK
UV-Detektor, Econo UV Monitor	Bio-Rad, USA
Vortex Mixer SA 8	Stuart, UK
Zentrifuge, 3E	Sigma-Aldrich, USA

7.4. Chemikalien

Chemikalien	Firma
Ameisensäure 98-100 % - Suprapur	Merck, Deutschland
Azetonitril	Merck, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
H ₃ PO ₄	Merck, Deutschland
HCL	Merck, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck, Deutschland
KCl	Roth, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Deutschland
KOH	Sigma Aldrich, Deutschland
NaCl	Sigma Aldrich, Deutschland
NaOH	Merck, Deutschland
Perchlorsäure 70 %	Merck, Deutschland
TEA	Sigma Aldrich, Deutschland
TFA	Sigma Aldrich, Deutschland

7.5. Software

Software	Firma
BioLogic LP Data View	Bio-Rad, USA
Compass 1.2	Bruker Daltonic, Deutschland
Compass 1.3	Bruker Daltonic, Deutschland
Data Analysis 4.0	Bruker Daltonic, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, USA

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Buntins (geb. Kühne), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Isolierung und Identifizierung urämischer Substanzen aus Adsorbereluatn der Prometheusstudie mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

8.1. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sophie Buntins (geb. Kühne) hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Brettschneider F, Tölle M, von der Giet M, Passlick-Deetjen J, Steppan S, Peter M, Jankowski V, Krause A, Kühne S, Zidek W, Jankowski J, Removal of protein-bound, hydrophobic uremic toxins by a combined fractionated plasma separation and adsorption technique., Artif Organs, 2013

Beitrag im Einzelnen:

Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Studie, chromatographische Probenaufbereitungen, Erstellung von Abbildungen, Gegenlesen des Manuskript
Der Anteil an dem Gesamtmanuskript liegt in dem Bereich von 10-15%.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

Brettschneider F, Tölle M, von der Giet M, Passlick-Deetjen J, Steppan S, Peter M, Jankowski V, Krause A, **Kühne S**, Zidek W, Jankowski J, Removal of protein-bound, hydrophobic uremic toxins by a combined fractionated plasma separation and adsorption technique., *Artif Organs*, 2013

11.Danksagung

Allem voran bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski, für die gute Betreuung und bei allen Mitarbeitern der ehemaligen AG Jankowski.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. rer. nat. Falko Böhringer für die Hilfsbereitschaft, vielen fachlichen Erläuterungen und aufmunternden Worte während der chromatographischen Aufarbeitung, Dr. rer. nat. Anna Schulz, die mir die Massenspektrometrie näher gebracht hat sowie Brigitte Egbers, der guten Seele des Labors.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die in allen Lebenslagen eine große Stütze für mich sind sowie bei meiner großen Schwester, die mir viele Hinweise und Ratschläge gegeben hat und immer ein offenes Ohr für Sorgen und Probleme hat.

Auch danke ich meinen beiden Freundinnen Jana und Inga für die hilfreichen Anmerkungen und Anteilnahme in allen Lebenslagen.

Zum Schluss danke ich noch meinem Ehemann für seine liebevolle Unterstützung, Geduld und unermüdlich positiver Zuversicht. Ohne dich hätte ich es nicht geschafft. Sowie bei meiner kleinen Tochter Mathilda, die mit ihrem Lächeln alle Mühen vergessen lässt.