

Aus dem Institut/der Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Calprotectin im Urin zur Differenzierung des prä- und intrarenalen
akuten Nierenversagens

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Sandra Frischmann
aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abstrakt	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Definition und Ursachen des akuten Nierenversagens	2
1.2 Epidemiologie des akuten Nierenversagens	3
1.3 Klinische Bedeutung des akuten Nierenversagens	4
1.4 Einteilung der verschiedenen Formen des akuten Nierenversagens	7
1.5 Einteilung der Schweregrade des akuten Nierenversagens	9
1.6 Diagnostik des akuten Nierenversagens	10
1.7 Therapie des akuten Nierenversagens	14
1.8 Prognose des akuten Nierenversagens.....	16
1.9 Calprotectin als Mediator des angeborenen Immunsystems	16
1.10 Calprotectin in der Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ...	19
1.11 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Studienpopulation und -design	20
2.2 Studienprotokoll	22
2.3 Messung von Calprotectin mittels ELISA.....	23
2.4 Immunhistochemie von Nierenbiopsaten	24
2.5 Statistik	25

3. Ergebnisse	26
3.1 Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe, den Patienten mit prärenalem und intrarenalem akuten Nierenversagen bezogen auf die gesamte Studienpopulation	26
3.2 Individuelle Messergebnisse der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio einer gesunden Kontrollgruppe, der Patienten mit prärenalem und intrarenalem akuten Nierenversagen bezogen auf die gesamte Studienpopulation.....	32
3.3 Individuelle Messergebnisse der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio der gesunden Kontrollgruppe, des prärenalen und des intrarenalen akuten Nierenversagen bezogen auf die gesamte Studienpopulation nach Ausschluss eines HWI.....	34
3.4 Diagnostische Genauigkeit von Calprotectin im Urin zur Abschätzung eines intrarenalen akuten Nierenversagens mittels ROC-Analysen	36
3.5 Immunhistochemie	41
4. Diskussion	44
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	44
4.2 Einordnung in bestehende Diagnostik	44
4.3 Erklärungsmöglichkeiten.....	45
4.4 Limitationen der Studie	49
4.5 Calprotectin als diagnostischer Marker im klinischen Alltag	50
4.6 Möglicher zukünftiger Einsatz in der Klinik (Schnelltest).....	51
4.7 Schlussfolgerungen.....	51
5. Zusammenfassung.....	52
6. Literaturverzeichnis.....	54
7. Anhang	59
7.1 Eidesstattliche Versicherung	59
7.2 Lebenslauf	60
7.3 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	62
7.4 Danksagung	63

Abstrakt

Einleitung

Bis heute gibt es keinen zuverlässigen Marker für die Differenzierung von prä- und intrarenalem akuten Nierenversagen. Es wurde untersucht, ob Calprotectin, ein Mediatorprotein des angeborenen Immunsystems, im Urin als diagnostischer Marker bei einem akuten Nierenversagen dienen kann.

Methodik

Durchgeführt wurde eine Querschnittsstudie mit 101 Probanden, davon 86 Patienten mit einem akuten Nierenversagen (34 prärenal, 52 intrarenal, davon 23 mit Harnwegsinfekten) und 15 gesunden Patienten als Kontrollgruppe. Die Messung der Calprotectinkonzentration im Urin erfolgte mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Ferner wurden immunhistochemische Untersuchungen von Nierenbiopsaten mit einem Calprotectin-Antikörper vorgenommen. Einschlusskriterien für die Studie waren: Aufnahme ins Krankenhaus mit einem akuten Nierenversagen des Stadiums 1 bis 3 (Acute Kidney Injury Network). Ausschlusskriterien waren: Zustand nach Nierentransplantation sowie eine obstruktive Uropathie.

Ergebnisse

Die mediane Calprotectinkonzentration im Urin war bei akutem intrarenalen Nierenversagen 60,7mal höher (1692 ng/ml, Interquartilsabstand 765-4735 ng/ml) als bei einem prärenalen Nierenversagen (28 ng/ml, Interquartilsabstand 13-73 ng/ml, $p < 0,001$). Die Calprotectinkonzentration zeigte sich bei einer prärenalen Genese nicht signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe (45ng/ml, Interquartilsabstand 19-139 ng/ml, $p = 0,25$). Die „Receiver Operating Characteristic Curve (ROC)“ Analyse zeigte eine hohe Genauigkeit von Calprotectin (area under the curve, AUC 0,97) für die Diagnose eines akuten intrarenalen Nierenversagens. Ein Grenzwert von 300ng/ml lieferte eine Sensitivität von 92,3% und eine Spezifität von 97,1%. Die Berechnung der Calprotectin-/Kreatinin-Ratio im Urin ergab keine Verminderung der diagnostischen Genauigkeit. Die immunhistochemischen Untersuchungen der Nierenbiopsate zeigten einen positiven Calprotectinnachweis beim intrarenalen akuten Nierenversagen und blieben beim prärenalen Nierenversagen negativ.

Schlussfolgerung

Der diagnostische Wert von Calprotectin im Urin in der Differenzierung von akutem prä- und intrarenalen Nierenversagen ist hoch. Während die Calprotectinkonzentrationen bei einer prärenalen Genese vergleichbar sind mit gesunden Probanden, führt ein intrarenales akutes Nierenversagen zu erhöhten Calprotectinkonzentrationen.

Abstract

Introduction

To date there is no reliable marker for the differentiation of prerenal and intrinsic acute kidney injury (AKI). We investigated whether urinary calprotectin, a mediator protein of the innate immune system, may serve as a diagnostic marker in AKI.

Methods

This was a cross-sectional study with 101 subjects including 86 patients with AKI (34 prerenal, 52 intrinsic including 23 patients with urinary tract infection) and 15 healthy controls. Assessment of urinary calprotectin concentration was performed by ELISA. Moreover, immunohistochemistry of kidney biopsy specimens was conducted using a calprotectin antibody. Inclusion criteria were: admission to hospital for AKI stage 1 to 3 (Acute Kidney Injury Network); exclusion criteria were: prior renal transplantation and obstructive uropathy.

Results

Median urinary calprotectin was 60.7 times higher in intrinsic AKI (1692 ng/ml, interquartile range 765-4735 ng/ml) than in prerenal AKI (28 ng/ml, interquartile range 13-73 ng/ml, $p < 0.001$). Urinary calprotectin in prerenal disease was not significantly different from healthy controls (45 ng/ml, interquartile range 19-139 ng/ml, $p = 0.25$). Receiver operating curve analysis revealed a high accuracy of calprotectin (area under the curve, AUC 0.97) in predicting intrinsic AKI. A cutoff level of 300ng/ml provided a sensitivity of 92.3% and a specificity of 97.1%. Calculating urinary calprotectin/creatinine ratios did not lead to a further increase of accuracy. Immunostainings of kidney biopsies were positive for calprotectin in intrinsic AKI and negative in prerenal AKI.

Conclusion

Accuracy of urinary calprotectin in the differential diagnosis of AKI is high. Whereas calprotectin levels in prerenal disease are comparable with healthy controls, intrinsic AKI leads to highly increased calprotectin concentration.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinisch-pathophysiologische Einteilung des akuten Nierenversagens.....	2
Abbildung 2: Inzidenz des akuten Nierenversagens (ANV) von 1992 bis 2001	3
Abbildung 3: Mortalität des akuten Nierenversagens in Abhängigkeit des Serumkreatinins.....	6
Abbildung 4: Einteilung der verschiedenen Formen des akuten Nierenversagens	8
Abbildung 5: Diagnostik des akuten Nierenversagens	11
Abbildung 6: Therapie des akuten Nierenversagens.....	15
Abbildung 7: Calprotectin als endogener Ligand von TLR4 exprimiert auf einem Monozyten.	18
Abbildung 8: Calprotectinkonzentrationen der gesamten Studienpopulation.....	32
Abbildung 9: Ratio der Konzentrationen von Calprotectin und Kreatinin im Urin in der gesamten Studienpopulation.....	33
Abbildung 10: Calprotectinkonzentrationen im Urin in der Studienpopulation ohne HWI	35
Abbildung 11: Calprotectin-/Kreatininratio in der Studienpopulation ohne HWI.....	35
Abbildung 12: ROC Analyse von Calprotectin im Urin zur Diagnostik eines intrarenalen akuten Nierenversagens	37
Abbildung 13: ROC-Analyse der Calprotectin-/Kreatininratio im Urin zur Diagnose eines intrarenalen akuten Nierenversagens.....	37
Abbildung 14: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch Calprotectin im Urin in der Studienpopulation ohne Harnwegsinfektion.....	38
Abbildung 15: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch die Calprotectin-/ Kreatininratio im Urin in der Studienpopulation ohne HWI.....	38
Abbildung 16: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch die fraktionelle Natriumausscheidung Fe_{Na}	39
Abbildung 17: ROC Analyse zur Identifizierung eines akuten intrarenalen Nierenversagens durch die Proteinurie	39
Abbildung 18: Diagnostische Performance von Calprotectin im Urin mit einem Grenzwert von 300ng/ml für die Einteilung eines prärenalen und intrarenalen akuten Nierenversagens.....	40
Abbildung 19: Histologien der Nierenbiopsien in PAS-Färbung	42
Abbildung 20: Vorschlag für einen Algorithmus zur Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens unter Anwendung von Calprotectin im klinischen Alltag	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung	10
Tabelle 2: Urindiagnostik zur Differenzierung eines prärenalen und eines intrarenalen akuten Nierenversagens	13
Tabelle 3: Diagnosekriterien zur Differenzierung zwischen einem prärenalen und einem intrarenalen akuten Nierenversagen ohne Vorliegen einer histologischen Diagnose..	21
Tabelle 4: Studienpopulation bezogen auf die Epidemiologie.....	27
Tabelle 5: Ursachen eines akuten Nierenversagens bezogen auf die vorliegende Studienpopulation.	28
Tabelle 6: Häufigste Begleiterkrankungen sowie Medikation bei stationärer Aufnahme.....	29
Tabelle 7: Entscheidende klinische Laborparameter zur Einschätzung eines akuten Nierenversagens....	30
Tabelle 8: Einteilung des prärenalem und intrarenalen akuten Nierenversagen entsprechend der AKIN-Kriterien bezogen auf die vorliegende Studienpopulation.	31
Tabelle 9: Darstellung der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio zur Ermittlung eines intrarenalen akuten Nierenversagens bezogen auf die vorliegende Studie	41

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme - Hemmer
AKI	Acute Kidney Injury
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ANV	Akutes Nierenversagen
APAAP-Technik	Alkalische Phosphatase antialkalische Phosphatase - Technik
AUC	Area under the Curve
BMI	Body Mass Index
°C	Grad Celsius
CD14	Cluster of Differentiation 14
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Damage associated Molecular Patterns
dl	Deziliter
EBV	Epstein Barr Virus
eGFR	Estimated glomerular Filtration Rate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESRD	End Stage Renal Disease
FE_{Na}	Fraktionierte Natriumexkretion
g	Gramm
G	Gauge
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HWI	Harnwegsinfekt
IL	Interleukin

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mmol	Millimol
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAS-Reaktion	Periodic Acid Schiff-Reaktion
pg	Picogramm
RIFLE	Risk Injury Failure Loss ESRD
ROC	Receiver Operating Characteristic
TTP	Thrombotisch - Thrombozytopenische Purpura
U_{Krea}	Harn-Kreatinin
U_{Na}	Harn-Natrium
US	Ultraschall

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem alltäglichen klinischen Problem in der Nephrologie und hat das Ziel, eine entscheidende diagnostische Lücke in der Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens zu schließen. Das Vorliegen dieses Krankheitsbildes ist anhand der Retentionsparameter und der Urinausscheidung klinisch leicht zu diagnostizieren. Seine Ursachen sind hingegen oft nur mit größerem Aufwand identifizierbar. Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit dem Problem, dass derzeit kein laborchemischer Marker existiert, der ein prärenal bedingtes Nierenversagen von einem intrarenalen Nierenversagen unterscheiden kann. Für den klinischen Verlauf ist es jedoch von großer Bedeutung frühzeitig eine Differenzierung vorzunehmen, da es wesentlich ist zeitnah mit der Therapie zu beginnen. Ein postrenales akutes Nierenversagen kann leicht durch die Sonographie gesichert werden. Zum sicheren Nachweis eines intrarenalen akuten Nierenversagens ist eine Nierenbiopsie durchzuführen. Diese ist bei einem prärenalen Typ jedoch überflüssig und um den betroffenen Patienten diese invasive und ein Komplikationsrisiko tragende Untersuchung ersparen zu können, ist daher eine sichere Differenzierung von prärenal und intrarenal Genese des Nierenversagens notwendig. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob Calprotectin, ein Mediatorprotein des angeborenen Immunsystems, diese diagnostische Lücke schließen kann.

Eine prospektive Querschnittsstudie wurde an 101 Probanden, davon 86 Patienten mit akutem Nierenversagen (34 prärenal, 52 intrarenal, einschließlich 23 Patienten mit Harnwegsinfektionen) und 15 gesunden Teilnehmern als Kontrollgruppe durchgeführt. In dieser Studie wurde die diagnostische Aussagekraft von Calprotectin im Urin in der Differentialdiagnose des Nierenversagens untersucht.

1.1 Definition und Ursachen des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen ist definiert als eine rasche Abnahme der Nierenfunktion mit Reduktion der Harnproduktion und/oder einer Retention harnpflichtiger Substanzen [1]. Es kann innerhalb von Tagen oder Stunden auftreten und ist prinzipiell reversibel. Der Verlauf des akuten Nierenversagens ist häufig gekennzeichnet durch die sogenannte Oligurie (<500ml Urin/24h) oder Anurie (<100ml Urin/24h) [1], kann aber auch mit einer normalen oder erhöhten Urinproduktion einhergehen (>3000ml Urin/24h).

Ursächlich hierfür kann eine Vielzahl an Erkrankungen sein, die mit dem Verlust der glomerulären Filtrationsrate einhergehen und einen Anstieg des Serumkreatinins zur Folge haben. Die aktuelle Definition und Einteilung des akuten Nierenversagens wird an den sogenannten Acute Kidney Injury Network (AKIN)-Kriterien (Tabelle 1) festgemacht [2].

Es hat sich beispielsweise gezeigt, dass bereits ein Anstieg um 0,3mg/dl des Serum-Kreatinins bei hospitalisierten Patienten mit einer Erhöhung der Mortalität um 80% einhergeht [3]. Dieses Erkenntnis hat dazu geführt, dass ein Kreatininanstieg in dieser Größenordnung als Stadium I des akuten Nierenversagens nach AKIN definiert wird. Als Ursachen dieser Erkrankung kommen mehrere Gründe in Betracht: eine Hypoperfusion sowie Hypotonie der Nieren, eine kausale Nierenerkrankung (z.B. Erkrankungen der Nierengefäße, der Glomeruli oder des Interstitiums) oder aber eine bestehende Abflussbehinderung in den Harnwegen. Je nach Ursprung des akuten Nierenversagens wird zwischen einem prärenalen (50%), intrarenalen (35-40%) und postrenalen Nierenversagen (10-15%) unterschieden [1,4]. In Kapitel 1.4 werden die einzelnen Formen näher dargestellt und erläutert. Eine kurze Vorschau liefert zunächst Abbildung 1.

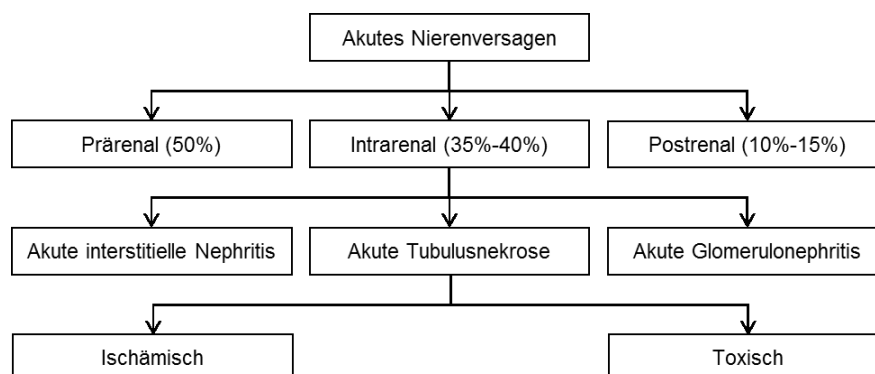


Abbildung 1: Klinisch-pathophysiologische Einteilung des akuten Nierenversagens [1].

1.2 Epidemiologie des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen ist bis heute die häufigste und teuerste Nierenerkrankung bei hospitalisierten Patienten [5]. Unabhängig von bestehenden Begleiterkrankungen weist sie eine Morbidität und Mortalität von 10% der Patienten auf der Normalstation sowie 30-50% der Patienten auf der Intensivstation auf [5]. Trotz Fortschritte in der Medizin sind diese im Vergleich zu den vorherigen Jahren unverändert hoch geblieben.

Spezielle Patientengruppen weisen eine erhöhte Prädisposition für die Entwicklung eines akuten Nierenversagens auf. So belegen Studien, dass 30-40% der intensivpflichtigen Patienten ein akutes Nierenversagen entwickeln, aber auch Patienten nach Bypass-Operation (15%) sowie nach septischem Schock oder bestehender schwerer Sepsis [5].

Die herrschende Uneinheitlichkeit in Bezug auf die Definition des akuten Nierenversagens macht eine Datenerfassung schwierig. Die Inzidenzrate des akuten Nierenversagens nimmt jedoch derzeit nach US-amerikanischen Daten um etwa 11% jährlich zu (siehe Abbildung 2).

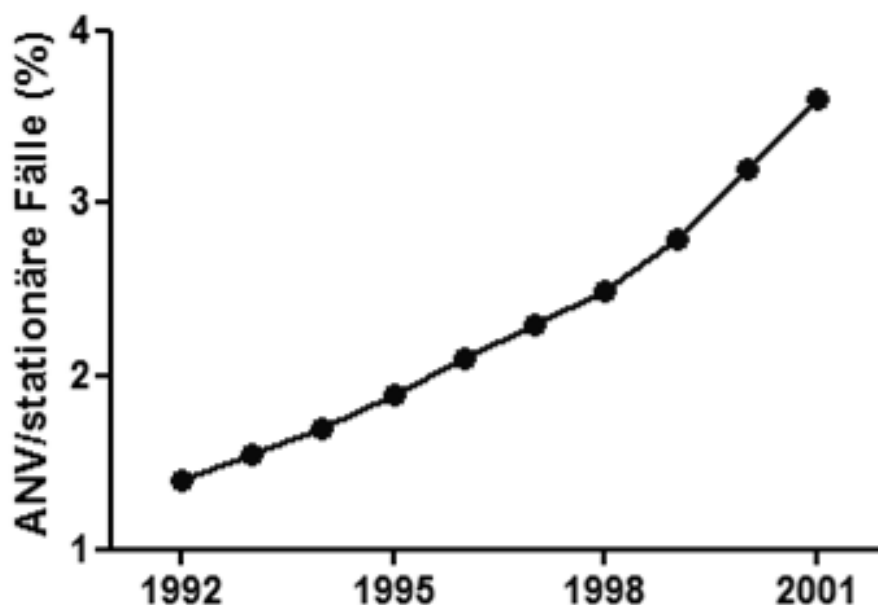


Abbildung 2: Inzidenz des akuten Nierenversagens (ANV) von 1992 bis 2001 [6].

1.3 Klinische Bedeutung des akuten Nierenversagens

Hauptursächlich für das Auftreten eines akuten Nierenversagens im Krankenhaus sind der prärenale und intrarenale Typ. Diese beiden Ursachen zusammengenommen sind in 70-75% der Fälle verantwortlich für das Vorliegen eines akuten Nierenversagens. Es zeigt sich typischerweise ein phasenhafter Verlauf, der sowohl für die klinische Entwicklung, als auch für seine Bedeutung in der Praxis wichtig ist.

Normalerweise werden vier Phasen durchlaufen [7]. In der Regel fehlen in Stadium 1 spezifische Symptome. Es beinhaltet die Initial- bzw. Schädigungsphase. Die Klinik des Patienten wird vom auslösenden Ereignis wie Hypotonus oder Hypovolämie beim prärenalen akuten Nierenversagen oder aber durch Glomerulonephritiden und Vaskulitis beim intrarenalen Typ bestimmt.

Die Dauer kann Stunden bis Tage betragen bei weitestgehend normaler Nierenfunktion. Dies bedeutet, dass die Diurese so gut wie kaum eingeschränkt ist und es lediglich zu einem minimalen Anstieg des Serumkreatinins kommt. In der Frühphase fehlen meist spezifische Symptome, so dass die Schädigungsphase daher oft erst rückblickend erfasst wird.

Die Schädigungsphase wird vom Stadium 2, der Phase der Oligurie bzw. Anurie, abgelöst. Als Oligurie wird die Abnahme der altersentsprechenden Urinausscheidung auf <500ml Urin/24h definiert [1]. Als Anurie bezeichnet man das Absinken bzw. Versiegen der Urinausscheidung auf <100ml Urin/24h. Es kommt zusätzlich zu einem Anstieg der Retentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff) im Serum. Des Weiteren können sich Elektrolytstörungen, vor allem eine Hyperkaliämie [7], sowie Zeichen der Überwässerung mit arterieller Hypertonie, peripheren Ödemen, ggf. auch Zeichen eines Lungenödems, präsentieren. Die Dauer dieses Zustandes kann eine bis maximal zehn Wochen betragen.

Die Erholungsphase bzw. polyurische Phase kennzeichnet das Stadium 3. Kommt es zu einer Erholung der Tubuluszellen und damit zu einer Wiederaufnahme der Nierenausscheidungsfunktion, so verläuft diese oft polyurisch mit einer Ausscheidung von über 3000ml Urin/Tag [7]. Der Urin ist hypoton, da zunächst die tubuläre Konzentrationsfähigkeit vermindert ist und aufgrund der hohen Serumharnstoffkonzentration eine osmotische Diurese ausgelöst wird. Es besteht in dieser Phase vor allem die Gefahr der Dehydratation mit Elektrolytverlust.

Die Dauer von Stadium 3 kann Tage bis Wochen betragen und wird letztendlich von der sogenannten Regenerationsphase, der Phase 4, abgelöst. Über einen bis drei, maximal zwölf Monate, kommt es zu einer Normalisierung der Diurese und damit zur Erholung der Nierenfunktion.

Komplikationen, die sich aus einem akuten Nierenversagen ergeben können, leiten sich aus der Konsequenz des Sistierens der exkretorischen Nierenfunktion sowie der gestörten Wasserausscheidung ab. Aufgrund der starken Überwässerung und des Anstiegs der Elektrolyte im Serum ist vor allem während der oligurischen Phase die Gefahr des Lungenödems (fluid lung) gegeben. Es kommt zur ausgeprägten Dyspnoe mit radiologisch nachweisbaren Infiltraten in der Lunge.

Infolge der verminderten Urinausscheidung bei anhaltender Kaliumfreisetzung kommt es häufig zur Ausbildung einer Hyperkaliämie (kann zunächst bis zu einem Wert von 6,0-6,5mg/dl asymptomatisch sein) mit Herzrhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern und Herzstillstand [7].

Mit ansteigenden Harnsäurewerten zeigt sich im Verlauf das Bild der Hyperurikämie mit Übelkeit, Erbrechen sowie Benommenheit bis hin zum Koma. Bezeichnend hierfür ist der Foeter uraemicus, der typisch beißende Geruch in der Atemluft betroffener Patienten.

Da die Therapie eines akuten Nierenversagens invasive Zugangswege wie die Katheterisierung der Blase, eine Tubusanlage sowie das Legen intravenöser Zugänge verlangt, kann es im Verlauf zu iatrogen bedingten infektiösen Komplikationen kommen. Diese können in einer Sepsis enden [8]. Abbildung 3 verdeutlicht die Beziehung der Mortalität des akuten Nierenversagens in Bezug zum Serumkreatinin.

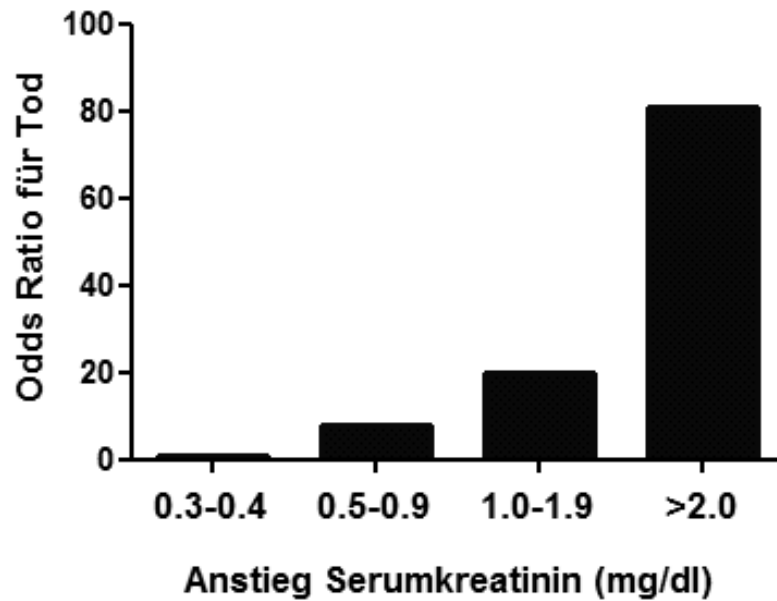


Abbildung 3: Mortalität des akuten Nierenversagens in Abhängigkeit des Serumkreatinins [3].

Da die Therapieoptionen eines akuten Nierenversagens beschränkt sind, erscheint es umso wichtiger dieser Erkrankung präventiv entgegenzuwirken, um so die Sterblichkeit zu senken. Hierzu gehört es, bestehende Risikofaktoren bei der Entwicklung des Krankheitsbildes frühzeitig zu identifizieren und umfassend zu korrigieren. Ca. 40% der überlebenden Patienten nach einem akuten Nierenversagen entwickeln eine leichte bis mittelgradige chronische Niereninsuffizienz, weitere 10% sogar eine terminale Niereninsuffizienz [9].

Patienten, die nach einer Nierentransplantation ein akutes Nierenversagen aufweisen, zeigen einen verzögerten Beginn der Aufnahme der Transplantatfunktion mit Erhöhung der Sterblichkeit und verkürzter Überlebenszeit des Transplantates [10].

1.4 Einteilung der verschiedenen Formen des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen lässt sich in drei Gruppen einteilen (Abbildung 4). Der prärenale Typ, welcher ca. 50% aller Fälle ausmacht, ist gekennzeichnet durch die Intaktheit der tubulären und glomerulären Strukturen bei gleichzeitiger Minderperfusion des Nierenparenchyms. Es handelt sich hierbei also lediglich um eine rein funktionelle Nierenstörung. Die Gründe für den Nierenfunktionsverlust sind vielseitig. Als wichtigste Ursachen kommen hierfür die Hypovolämie sowie die kardiovaskuläre Insuffizienz in Betracht. Die Hypovolämie entsteht beispielsweise häufig aufgrund einer Dehydratation bei gastrointestinalen Infekten, akuter Blutung oder durch Sequestration von Extrazellulärflüssigkeit, wie es bei Verbrennungen, Pankreatitis oder Peritonitis der Fall sein kann. Eine akute Hypotonie bringt ein vermindertes Herzminutenvolumen mit sich, das wiederum zu der oben beschriebenen Minderperfusion der Nieren führen kann. Gründe hierfür stellen Myokardinfarkte, eine Tamponierung des Perikards sowie das Pooling im Gefäßsystem bei Anaphylaxie oder Sepsis dar. Lassen sich die Ursachen schnell beseitigen, so ist diese Verlaufsform reversibel.

Unter einem intrarenalen akuten Nierenversagen versteht man die Tubuluszellschädigung der Niere, die im schlimmsten Fall zur Tubulusnekrose führen kann. Ein intrarenaler Sauerstoffmangel verursacht eine verminderte Nierenperfusion, wodurch es zum Ablösen des Epithels von der Basalmembran kommt [1]. Infolge dieser kommt es zu einer Verstopfung der Tubuli durch abgestoßenes Tubulusepithel sowie zu einem Funktionsverlust der Tubulusepithelien. Die Folge ist eine Abnahme der glomerulären Filtration mit einem Absinken der Natriumrückresorption sowie ein Anstieg der Natriumkonzentration im Urin. Eine akute Tubulusnekrose kann ischämisch oder toxisch auftreten. Weitere wichtige Ursachen sind entzündliche Nierenerkrankungen, wie die akute interstitielle Nephritis und die Glomerulonephritis, aber auch vaskuläre Nierenerkrankungen im Sinne einer Vaskulitis oder eines Nierenarterienverschlusses (Abbildung 1). Die Einnahme nephrotoxischer Medikamente kann diesen Effekt zusätzlich verstärken. Erkrankungen des Gefäßsystems durch Thrombembolien oder durch Vaskulitiden kommen ebenfalls als Gründe in Betracht. Entzündliche Nierenerkrankungen wie die Rapid-progressive Glomerulonephritis werden als mikrovaskuläre Ursachen beschrieben, ebenso das hämolytisch-urämische Syndrom [1].

Auch nephrotoxisch wirksame Medikamente sowie Infektionen (Zytomegalievirus/CMV, Epstein-Barr-Virus/EBV, Hantaan-Virus) müssen in Betracht gezogen werden. Der intrarenale Typ macht durchschnittlich ca. 35-40% aller Fälle von akutem Nierenversagen aus.

Das postrenale akute Nierenversagen wird definiert als Folge einer Obstruktion der ableitenden Harnwege. Da normalerweise die Funktion einer Niere ausreichend ist, um alle harnpflichtigen Substanzen ausscheiden zu können, muss es sich bei einem postrenalen Typ um die Obstruktion beider Harnleiter (durch Steine, Blutkoagel, Eiter) oder aber um eine Obstruktion innerhalb oder distal der Blase handeln. Auch maligne Tumore müssen berücksichtigt werden. Selten kommen angeborene Fehlbildungen als Ursache in Frage. Die postrenale Form macht ca. 10-15% aller Fälle von akutem Nierenversagen aus und ist somit eine eher selten vorkommende Diagnose.

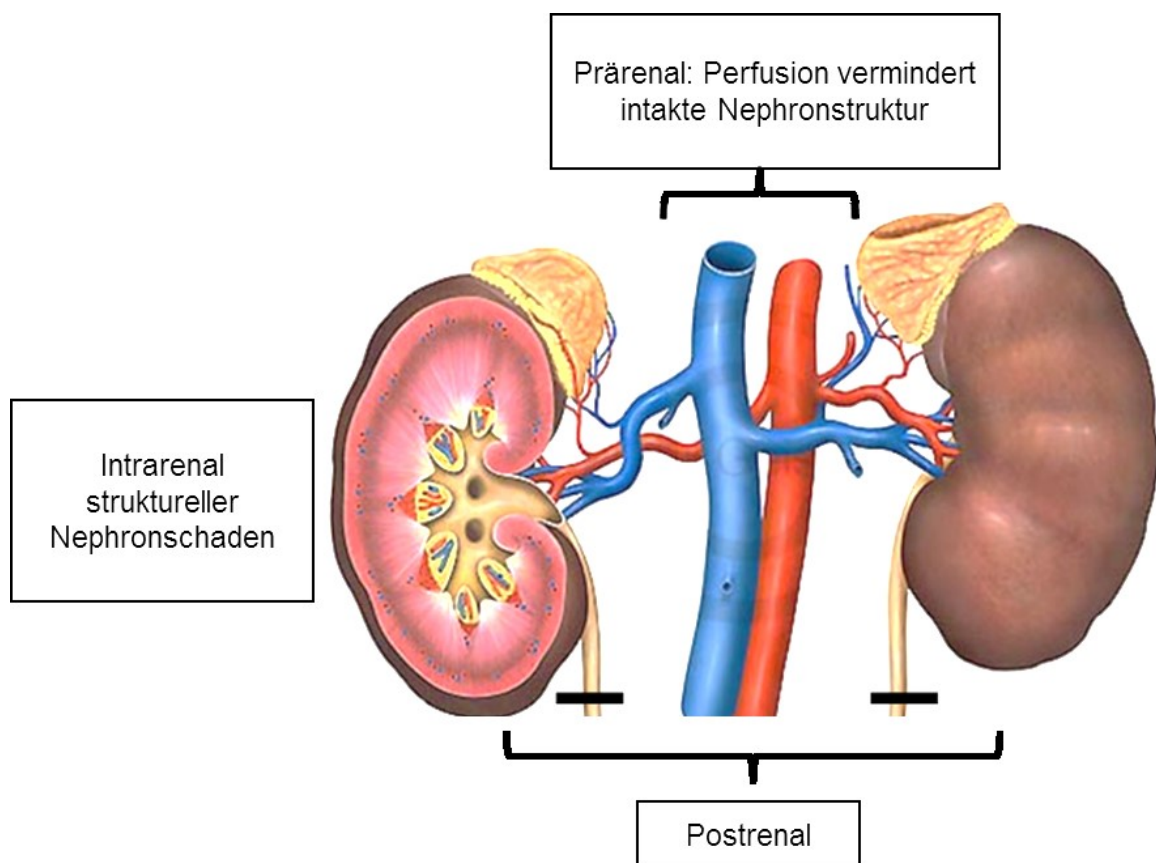


Abbildung 4: Einteilung der verschiedenen Formen des akuten Nierenversagens.

1.5 Einteilung der Schweregrade des akuten Nierenversagens

Das Spektrum des Nierenversagens reicht von einem minimalen Serumkreatininanstieg bis hin zum völligen Versiegen der Nierenfunktion. Im Jahre 2004 wurden zunächst auf einer internationalen Konsensuskonferenz die zahlreichen Definitionen eines akuten Nierenversagens zu den sogenannten „Risk-Injury-Failure-Loss-ESRD“ (RIFLE)-Kriterien zusammengefasst [11]. Seitdem besteht erstmalig eine einheitliche Definition und Stadieneinteilung.

Im Jahr 2007 entstanden die AKIN-Kriterien, die bis heute gültig sind [2]. Nach dieser Definition liegt ein akutes Nierenversagen vor, wenn die Nierenfunktion innerhalb kürzester Zeit (innerhalb von 48 Stunden) abnimmt, gemessen an:

- einem absoluten Anstieg des Serum-Kreatinins über/gleich 0,3mg/dl,
- einem prozentualen Anstieg des Serum-Kreatinins über/gleich 50% (auf das 1,5-fache des Ausgangswertes)

oder

- eine Verminderung der Urin-Ausscheidung unter 0,5ml/kg/h über mehr als sechs Stunden.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung [2].

RIFLE-Stadium	AKIN-Stadium	Serum-Kreatinin	Urinausscheidung
Risk	1	1,5- bis 2-facher Kreatininanstieg (RIFLE/ AKIN) oder	<0,5 ml/kg/h über 6 h
		Kreatininanstieg $\geq 0,3$ mg/dl (AKIN)	
Injury	2	2- bis 3-facher Kreatininanstieg	<0,5 ml/kg/h über 12 h
Failure	3	>3-facher Kreatininanstieg oder	<0,3 ml/kg/h über 24 h oder
		Serum-Kreatinin >4 mg/dl mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5$ mg/dl	fehlende Urinausscheidung (Anurie) über 12 h
Loss	*	Dauerhaftes Nierenversagen für >4 Wochen	
ESRD	*	Dauerhaftes Nierenversagen für >3 Monate	
*) Die RIFLE-Stadien „Loss“ und „ESRD“ (End-Stage-Renal-Disease) werden als Spätfolgen der akuten Nierenschädigung in der AKIN-Stadieneinteilung nicht mehr berücksichtigt.			

1.6 Diagnostik des akuten Nierenversagens

Normalerweise fällt ein akutes Nierenversagen durch den Anstieg der harnpflichtigen Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff im Serum oder eine fehlende Urinproduktion auf. Somit ist das akute Nierenversagen als solches klinisch eindeutig diagnostizierbar. Die Differentialdiagnose der zugrunde liegenden Ursachen ist hingegen sehr viel schwieriger. Hier ist der erste Schritt die Zuordnung des Krankheitsbildes zu den Kategorien prärenal, intrarenal und postrenal.

Während die postrenale Form im Ultraschall einfach erkennbar ist, fällt die Differenzierung eines prärenalen von einem intrarenalen akuten Nierenversagen schwer. Anamnestisch ist es nicht selten, dass die Einnahme von Medikamenten wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Antibiotika (Aminoglykoside, Cephalosporine) oder Röntgenkontrastmittel als Ursache eines akuten Nierenversagens in Betracht kommen [12]. Ebenso kann die Frage nach vorbestehenden Erkrankungen des harnableitenden Systems Hinweise auf das Vorliegen dieses Krankheitsbildes geben.

Sonographisch lässt sich die postrenale Form leicht sichern, jedoch gestaltet sich dies in der diagnostischen Differenzierung zwischen prä- und intrarenalem Typ deutlich schwieriger (siehe Abbildung 5).

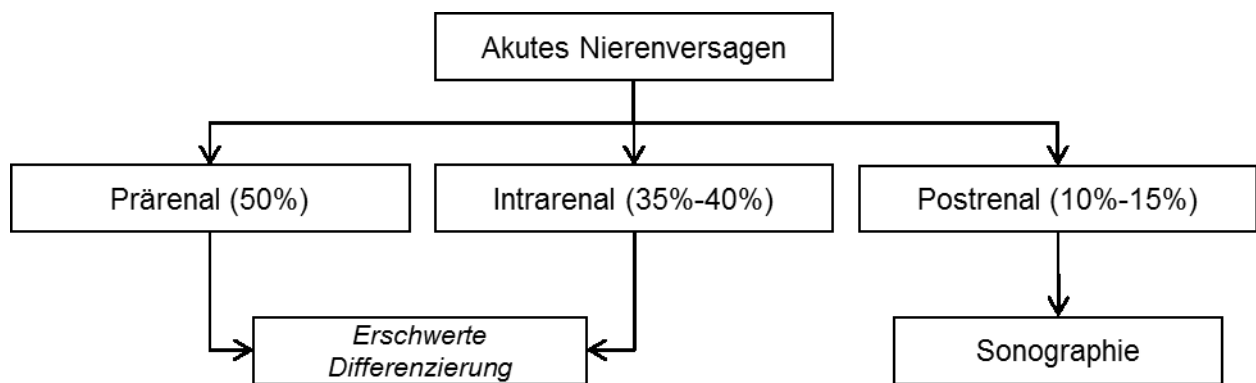


Abbildung 5: Diagnostik des akuten Nierenversagens (eigene Darstellung).

Im Ultraschall können sich bei einzelnen Unterformen des intrarenalen akuten Nierenversagens eher große Nieren mit verdichtetem, leicht verbreitertem Parenchym und daher sichtbaren Markpyramiden zeigen. Diese Methode erfordert immer einen erfahrenen Untersucher und erlaubt keine sichere Zuordnung, da diese Zeichen unspezifisch sind und zusätzlich nur bei einem Teil der Patienten mit intrarenalem Typ vorhanden sind. Sofern keine Anurie des Patienten vorliegt, gibt die Urindiagnostik hingegen weitere Aufschlüsse in der Differenzierung des akuten Nierenversagens. Am häufigsten wird zu diesem Zweck die fraktionierte Natriumexkretion verwendet (FE_{Na}) [13].

FE_{Na} ist definiert als:

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} \times P_{Krea}}{P_{Na} \times U_{Krea}} \times 100$$

U_{Na}: Harn-Natrium

P_{Na}: Plasma-Natrium

U_{Krea}: Harn-Kreatinin

P_{Krea}: Plasma-Kreatinin

FE_{Na} gibt an, wie viel Natrium, das in den Glomeruli der Niere filtriert wurde, tatsächlich mit dem Urin ausgeschieden wird. Typischerweise beträgt die fraktionierte Natriumexkretion beim prärenalen Typ unter 1% und belegt somit eine Natriumretention.

Bei der intrarenalen Form beträgt sie über 1%, was für eine verminderte Konzentrationsfähigkeit der Nieren spricht (siehe Tabelle 2). In der Vergangenheit hat sich jedoch gezeigt, dass die FE_{Na}-Bestimmung in mehreren Fällen keine hohe Aussagekraft besitzt.

Diese Methode der Urinanalyse unterliegt zahlreichen Störfaktoren und ist nicht besonders spezifisch. So ist FE_{Na} bei gleichzeitiger Diuretikaeneinnahme zur Diagnostik ungeeignet, da diese Medikamentengruppe die Natriumexkretion unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache des akuten Nierenversagens steigert [14]. Bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz oder einer Leberzirrhose, die eine Verminderung des effektiven Blutvolumens mit sich bringt, finden sich meistens verringerte FE_{Na}-Level. Auch dies ist ein Grund dafür, dass die Interpretation der FE_{Na} keine Rückschlüsse auf das Vorliegen eines prärenalen gegenüber einem intrarenalen Typs erlaubt. FE_{Na} hat sich außerdem als ungeeigneter Marker bei älteren Patienten mit verschiedenen präexistenten Grunderkrankungen gezeigt.

Die Urindiagnostik zur Differenzierung eines prärenalen und intrarenalen akuten Nierenversagens zeigt eine weitere Betrachtungsmöglichkeit bezogen auf die Harn-Natrium-Konzentration auf, wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 2: Urindiagnostik zur Differenzierung eines prärenalen und eines intrarenalen akuten Nierenversagens [15].

Parameter	Prärenales ANV	Intrarenales ANV
U_{Na}	< 10 mmol/l	> 20 mmol/l
FE_{Na}	< 1%	> 1%

Bei beiden Formen des akuten Nierenversagens zeigen sich erhöhte Retentionsparameter. Ein Absinken von Kreatinin und Harnstoff nach Therapiebeginn während der ersten 24-72 Stunden deutet auf das Vorliegen einer prärenalen Ursache des Krankheitsbildes hin. Beim intrarenalen Typ lässt sich hingegen nach Volumensubstitution keine Besserung erzielen, somit ist es unabdingbar eine Nierenbiopsie durchzuführen, um sofort und unverzögert mit der entsprechenden kausalen Therapie zu beginnen.

Es erscheint daher einleuchtend, dass keine 72 Stunden bis zur Differenzierung des prärenalen/intrarenalen akuten Nierenversagens gewartet werden dürfen, da sich bei einer intrarenalen Genese die Prognose des Patienten deutlich verschlechtern würde. Letztendlich kann die definitive Diagnose der intrarenalen Form einzig durch die Durchführung einer Nierenbiopsie [16] gesichert werden.

Diese jedoch, wie jedes invasive Verfahren, beinhaltet ein großes Spektrum an möglichen Komplikationen. Sie bleibt dennoch weiterhin unabdingbar, um die Diagnose eines intrarenalen akuten Nierenversagens eindeutig zu sichern. Für die Feststellung eines prärenalen Typs hat sie hingegen keine Bedeutung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bis zum heutigen Tage keinen zuverlässigen klinischen Marker gibt, der die Früherkennung eines prärenalen akuten Nierenversagens sichert.

Verschiedene Biomarker aus Urin und Serum finden sich aktuell noch in Erprobung. Empfindlichere und frühere Marker als das Serumkreatinin für die Diagnose eines akuten Nierenversagens sind unter anderem Cystatin C, Interleukin 18 (IL-18) und neutrophile-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin [17].

Während Serumkreatinin ein von der Muskelmasse des Patienten abhängiger Parameter ist, gilt dies für Cystatin C nicht. Cystatin C zeigt einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bereits ein bis zwei Tage vor Anstieg des Serumkreatinins an.

Ein ebenfalls häufig untersuchter Marker ist das IL-18, welches frühzeitig nach Beginn eines akuten Nierenversagens im proximalen Tubulus produziert und freigesetzt wird und ein proinflammatorisches Zytokin ist. Es wird in erhöhter Konzentration im Urin nachgewiesen und zeigt eine hohe Spezifität und Sensitivität in der Abgrenzung von Erkrankungen wie Harnwegsinfekten (HWI) oder chronischen Nierenerkrankungen. Eine sichere Vorhersage über den Ausgang eines akuten Nierenversagens ist jedoch nicht möglich.

Die oben genannten Marker sind vielversprechende Parameter für die Diagnostik und Prognose eines akuten Nierenversagens. Sie sind jedoch weiterhin in Erprobung und müssen vor dem Einsatz im klinischen Alltag weiter geprüft werden.

1.7 Therapie des akuten Nierenversagens

Um eine effiziente und schnelle Therapie des akuten Nierenversagens gewährleisten zu können, ist eine rasche Klärung der Ätiologie zentral. In jedem Fall ist eine Unterscheidung der prärenalen von der intrarenalen Form von elementarer Relevanz für die Festlegung eines geeigneten Therapieschemas (siehe Abbildung 6). Zunächst sollte die Behandlung einer potentiell zum akuten Nierenversagen führenden Grunderkrankung erfolgen. Als Beispiel seien hier die optimale Schocktherapie sowie das Absetzen möglicher Medikamente genannt, die nephrotoxisch wirken können (Kontrastmittel, Chemotherapeutika, Antibiotika). Bei vorhandenen renovaskulären Verschlusskrankheiten sollten Revaskularisierungsmaßnahmen getroffen werden.

Da der postrenale Typ durch die Obstruktion der ableitenden Harnwege gekennzeichnet ist, wäre eine Beseitigung des Hindernisses indiziert, ggf. muss eine transurethrale oder suprapubische Harnableitung vollzogen werden. Bei einem akuten prärenalen Nierenversagen gilt bis heute die Volumensubstitution mit Flüssigkeits- und Elektrolytbilanzierung als Goldstandard [18].

Eine Optimierung des Flüssigkeitshaushaltes und der systemischen Hämodynamik sollte erreicht werden. Des Weiteren müssen Medikamente, die einer renalen Ausscheidung unterliegen, in ihrer Dosis angepasst werden. Bei einem akuten Nierenversagen, das mit einer Oligurie einhergeht, muss die Aufrechterhaltung der Diurese erzielt werden [19]. Der Einsatz von Schleifendiuretika bewirkt in diesen Fällen die Steigerung der Diurese, diese haben jedoch keinen Einfluss auf die Regeneration der Nierenfunktion. Diuretika sollten daher nur als Übergangslösung eingesetzt werden und in keinem Fall den Beginn der Nierenersatztherapie verzögern.

Bei Vorliegen der intrarenalen Form ist häufig eine Nierenbiopsie notwendig, um die verschiedenen Ursachen voneinander unterscheiden zu können. Nach Sicherung der Diagnose erfolgt der Beginn einer spezifischen Therapie in Abhängigkeit vom histologischen Ergebnis (z. B. immunsuppressive Therapie). Kritisch kranke Patienten sollten bei Serumkreatininwerten von 4-6mg/dl und einem gleichzeitigen Serumharnstoff von 120-140mg/dl eine Nierenersatztherapie erhalten. Als Mittel der Behandlung stehen die Hämodialyse und die Hämofiltration zur Verfügung [20]. Beide Verfahren können kontinuierlich durchgeführt werden. Je schneller eine extrakorporale Therapie begonnen wird, desto weniger besteht die Gefahr, dass ein akut urämischer Zustand erreicht wird.

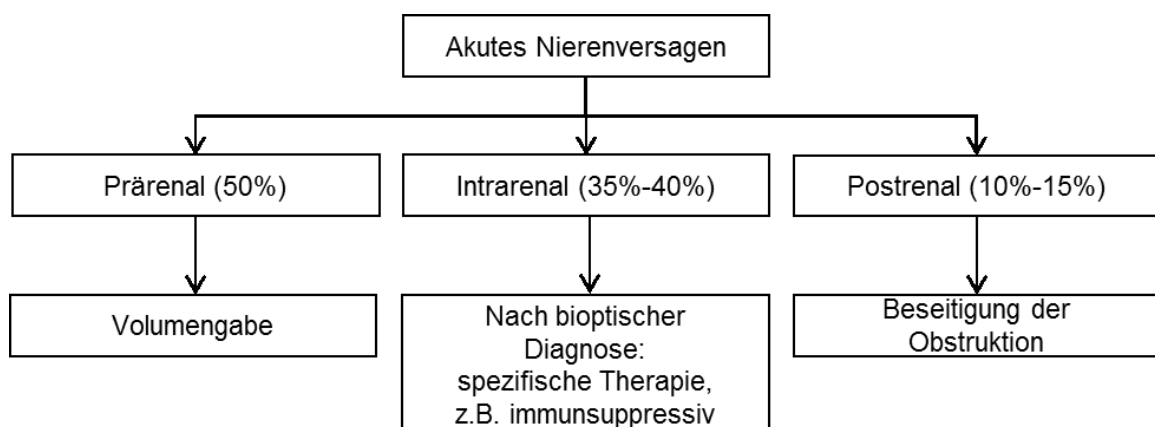


Abbildung 6: Therapie des akuten Nierenversagens (eigene Darstellung).

1.8 Prognose des akuten Nierenversagens

Werden Patienten aufgrund eines akuten Nierenversagens dialysepflichtig, wird ihre Lebenserwartung um sieben bis acht Jahre gesenkt. 12,5% der Patienten, die dieses Krankheitsbild überlebt haben, bleiben dialysepflichtig, 19-31% entwickeln eine chronische Niereninsuffizienz [21]. Je länger ein akutes Nierenversagen andauert, desto geringer ist das Langzeitüberleben in den darauffolgenden zehn Jahren [22]. Dies unterstreicht umso mehr, welche Bedeutung die frühzeitige Erkennung dieser Erkrankung mit der entsprechend eingeleiteten Therapie besitzt [23]. Die Prognose wird somit vom Zeitpunkt bestimmt, wann ein akutes Nierenversagen diagnostiziert wird.

Liegt ein akutes Nierenversagen vom intrarenalen Typ mit einer irreversiblen Schädigung der Nephrone vor, so gibt es hierfür aktuell keine Therapiemöglichkeiten. Längerfristige Folgen eines akuten Nierenversagens sind die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung über Dialysepflichtigkeit [24] bis hin zur Notwendigkeit einer Nierentransplantation und dem Tod des Patienten [25].

1.9 Calprotectin als Mediator des angeborenen Immunsystems

Bei Calprotectin handelt es sich um ein Calcium- und Zink-bindendes Protein, das vorwiegend aus Granulozyten, Monozyten und reaktivierten Makrophagen freigesetzt wird [26]. Es kann in Körperflüssigkeiten wie Serum, Stuhl und Urin sowie in renalen Epithelzellen nachgewiesen werden [27,28]. Es ist auch unter der Bezeichnung MRP-8/MRP-14 oder S100A8/S100A9 bekannt. Calprotectin besteht aus zwei schweren Ketten (14kDa) und einer leichten Kette (8kDa). Sein Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 1q21 [30]. Es stellt 60% der löslichen Bestandteile der neutrophilen Granulozyten dar.

Jeder Neutrophile besitzt 25 Picogramm (pg) Calprotectin. Calprotectin gibt das Maß der lokalen Entzündungsaktivität an [30,31] und besitzt eine hervorragende Stabilität bei Raumtemperatur für einen Zeitraum bis zu einer Woche [32,33,34].

Calprotectin ist ein Aktivator des angeborenen nicht spezifischen Immunsystems und besitzt antimikrobielle [35], chemotaktische [36] und apoptoseinduzierende [37] Eigenschaften. Es wird daher auch als Mediatorprotein des angeborenen Immunsystems bezeichnet. Nach Freisetzung in das Plasma führt Calprotectin zu einer Aktivierung von TLR4 (Toll-like Rezeptor 4) in Anwesenheit von CD14 (Cluster of Differentiation 14) und setzt so die Entzündung in Gang [38] (Abbildung 7).

Calprotectin, bestehend aus den Untereinheiten S100A8 und S100A9, ist ein Ligand des TLR4. TLR4 befindet sich auf Makrophagen und ist abhängig von CD14. CD14 beschreibt ein Oberflächenprotein, das auch auf Monozyten exprimiert wird, und zusammen mit TLR4 agiert. Wenn S100A8/S100A9 an TLR4 bindet löst dies einen autokrinen positiven Feedback-Loop aus. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und reaktiven Sauerstoffradikalen kommt [38] (Abbildung 7).

Mit der Bindung von S100A8/S100A9 kommt es zu der intrazellulären Aktivierung einer Kaskade, an deren Ende die inflammatorische Antwort steht. TLR4 ist auch an der Pathogenese verschiedener entzündlicher Nierenerkrankungen beteiligt. Hierzu gehören Glomerulonephritiden, Vaskulitiden und interstitielle Nephritiden [39,40,41,42].

Dringt ein Mikroorganismus in den menschlichen Körper ein, so werden neutrophile Granulozyten von diesem über Botenstoffe, den sogenannten Zytokinen, stimuliert und an den Ort des Geschehens angelockt. Die neutrophilen Granulozyten selbst schütten die sogenannten „damage-associated-molecular-pattern-proteins“ (DAMPs) aus, schadensassoziierte Molekular-Strukturproteine, zu denen auch Calprotectin gehört. Es aktiviert als Ligand von TLR4 eben genau diesen Abgaberezeptor und verstärkt zusammen mit CD 14 über eine intrazellulär ablaufende Kaskade die Entzündungsreaktion. Dies hat die Chemotaxis und Inflammation zur Folge.

Calprotectin hat sich als diagnostischer Marker vor allem in der Gastroenterologie etabliert. Durch die stattfindende Leukozytenmigration stimulierter neutrophiler Granulozyten in die Darmmukosa, ist es in hohen Mengen bei Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa im Stuhl nachweisbar [43]. Ebenso lässt es sich bei Darminfektionen oder bei Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltrakts, wie z.B. das Kolonkarzinom oder das Kolonadenom, nachweisen [44].

Calprotectin fungiert einerseits als (Früh-)Marker bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch als Aktivitätsmarker zur Ausarbeitung eines optimalen Therapiekonzeptes der betroffenen Patienten. Das Reizdarmsyndrom geht nicht mit der oben beschriebenen Migration stimulierter neutrophiler Granulozyten einher. Daher finden sich in diesen Fällen normwertige bis lediglich leicht erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl [30]. Es dient demnach auch als diagnostischer Marker zur Differenzierung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung versus eines nicht-entzündlichen Reizdarmsyndroms.

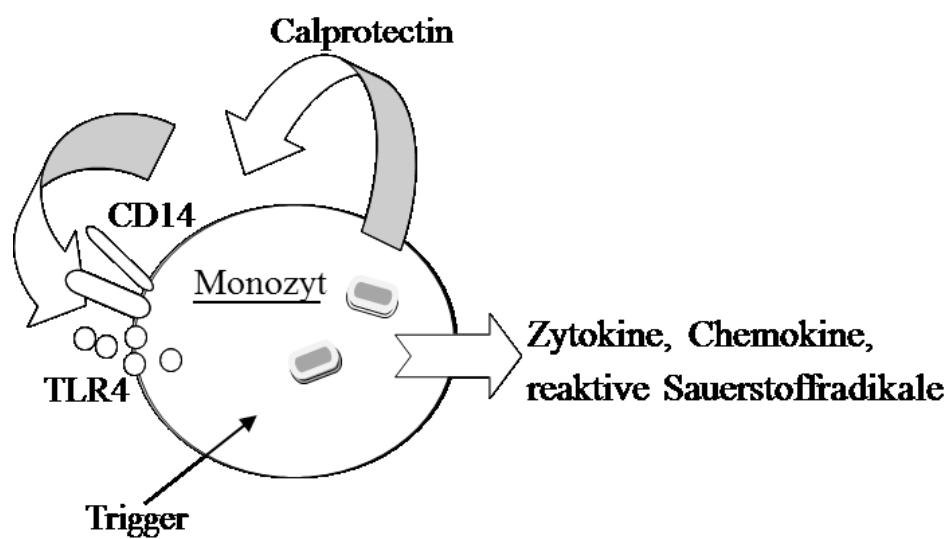


Abbildung 7: Calprotectin als endogener Ligand von TLR4 exprimiert auf einem Monozyten. Calprotectin initiiert und perpetuiert eine Entzündungsreaktion über Aktivierung des TLR4. Daraufhin erfolgt eine intrazelluläre Second-Messenger-Kaskade der TLR4-vermittelten Entzündungsreaktion durch Calprotectin. Calprotectin bindet als Ligand von TLR4 zusammen mit CD14 extrazellulär und fungiert auf diese Weise als Trigger der darauffolgenden Immunantwort (in Anlehnung an [38]).

1.10 Calprotectin in der Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Calprotectin als diagnostischer Marker ist in der Gastroenterologie bereits bekannt. Es wird eingesetzt, um funktionelle Störungen der Darmmotilität (Colon irritabile) von entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder M. Crohn zu differenzieren [45]. Calprotectin wird vor allem von Granulozyten, Monozyten und reaktivierten Makrophagen produziert [26].

Durch entzündliche Darmerkrankungen kommt es zu einer Zellproliferation, die eine Leukozytenmigration durch die Darmwand bewirkt. So kommt es, dass in Stuhlproben von betroffenen Patienten die Calprotectinkonzentration erhöht ist. Es wird auf diese Weise nicht nur zur Differenzierung eingesetzt, sondern auch als Aktivitätsmarker für das Therapiemonitoring. Die Höhe des Calprotectin im Stuhl korreliert mit der Entzündungsaktivität. Aufgrund der inflammatorischen Prozesse bei Erkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist Calprotectin um mehrere Zehnerpotenzen erhöht. Beim Colon irritabile finden sich hingegen normale Konzentrationen. Der Normwert im Stuhl beträgt $50\mu\text{g/g}$ [46].

1.11 Fragestellung

Analog zum Colon irritabile in der Gastroenterologie liegt dem akuten prärenalen Nierenversagen in der Nephrologie eine funktionelle Störung bei intakten epithelialen Strukturen des betroffenen Organs vor. Das intrarenale Nierenversagen hingegen ist durch primäre oder sekundäre inflammatorische Vorgänge charakterisiert, die mit einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems einhergehen. Die Arbeitshypothese dieser Untersuchung ist daher, dass beim prärenalen Typ signifikant geringere Calprotectinkonzentrationen im Urin auftreten als beim intrarenalen Nierenversagen. Diese Hypothese soll in Form einer prospektiven Erhebung an Patienten mit akutem Nierenversagen sowie gesunden Probanden als Kontrollgruppe untersucht werden.

Es ergibt sich folgende Fragestellung:

Mit welcher diagnostischen Aussagekraft lässt die Bestimmung der Calprotectinkonzentration im Urin eine Differenzierung des prä- und intrarenalen akuten Nierenversagens zu?

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation und –design

Es handelt sich um eine prospektive Singlecenter-/ Querschnittsstudie. Diese wurde in einem Zeitraum von Mai 2009 bis September 2010 an dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

Urinproben von erkrankten Patienten wurden drei Mal pro Woche auf der nephrologischen Station gesammelt. So wurde versucht, die Zeit zwischen Diagnose eines akuten Nierenversagens und das Sammeln der Urinproben unter drei Tagen zu halten. Die Menge betrug jeweils 10ml. Die Proben wurden bei -20°C ohne vorherige Zentrifugation gefroren bis die Bestimmung von Calprotectin im Urin stattfand. Die Urinkonzentration von Calprotectin im Urin wurde nach dem Herstellerprotokoll mittels ELISA (siehe Kapitel 2.3) bestimmt. Um den aktuellen Status der Urinkonzentration zu berücksichtigen, wurde zusätzlich Kreatinin im Urin beurteilt, um so die Calprotectin/Kreatininratio zu berechnen. Die Messungen wurden verblindet durchgeführt.

Voraussetzung für den Einschluss in diese Studie war das Vorliegen eines akuten Nierenversagens. Dieses wurde anhand der AKIN-Kriterien definiert. Es wurden demnach ein Anstieg des Serumkreatinins auf $\geq 0,3\text{mg/dl}$ bzw. ein Anstieg um $\geq 1,5\text{mg/dl}$ vom Ausgangswert oder eine Diureseeinschränkung auf unter $0,5\text{ml/kg/h}$ über einen Zeitraum größer sechs Stunden als Einschlusskriterien festgelegt. Eine Klassifikation anhand der AKIN-Kriterien in Stadien 1 bis 3 wurde für jeden Probanden durchgeführt.

Als Ausschlusskriterien galten das Vorliegen einer obstruktiven Uropathie sowie ein Zustand nach Nierentransplantation. Da ein intrarenales akutes Nierenversagen von einem prärenalen Typ nur mit Sicherheit durch eine histologische Untersuchung und damit durch eine Nierenbiopsie unterschieden werden kann, wurde diese als Goldstandard gewählt. Bei allen anderen Probanden, die keine Biopsie erhielten, wurde die Diagnose nach dem in Tabelle 3 präsentierten Algorithmus gestellt. Mandatorisches Kriterium für die Diagnose eines prärenalen Nierenversagens war die Besserung der Nierenfunktion nach Volumensubstitution (Kriterium der Kategorie A).

Anamnese, Untersuchungsbefund und die Ergebnisse einer Urinstreifentestuntersuchung wurden als Kriterien der Kategorie B eingestuft. Um das Vorliegen eines prärenalen akuten Nierenversagens zu sichern, mussten mindestens zwei Kriterien der Kategorie B sowie das mandatorische Kriterium der Kategorie A erfüllt sein.

Hepatorenales Syndrom, kardiorenales Syndrom sowie eine bilaterale Nierenarterienstenose wurden als prärenales akutes Nierenversagen unabhängig dieser Kriterien bewertet. Die vorliegende Studie wurde der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin/Berlin vorgelegt und von dieser bewilligt. Vor Untersuchungsbeginn wurde von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Diese lag zu Beginn der Studie vor.

Tabelle 3: Diagnosekriterien zur Differenzierung zwischen einem prärenalen und einem intrarenalen akuten Nierenversagen ohne Vorliegen einer histologischen Diagnose. Kriterien der Kategorie A sind obligatorisch, Kriterien der Kategorie B sind optional für die Diagnose eines prärenalen oder intrarenalen akuten Nierenversagens.

Klinische Kriterien	Prärenales ANV	Intrarenales ANV
A		
Ansprechen auf Volumensubstitution	Schneller Serumkreatininabfall mit Annäherung an die Vorwerte binnen 48 h	Keine Normalisierung der Nierenfunktion
B		
Passende Anamnese	Dehydratation, großer Flüssigkeitsverlust wegen Gastroenteritis, gesteigerte Einnahme von Diuretika, etc.	Prolongierter Schock, Einnahme von nephrotoxischen Substanzen, extrarenale Symptome einer Systemerkrankung mit Nierenbeteiligung
Untersuchungsbefund	Niedriger Blutdruck, Tachykardie, orthostatische Dysregulation, stehende Hautfalten	Keine Zeichen der Dehydratation
Urinstreifentest	Fehlen von Proteinurie, Hämaturie und/oder Leukozyturie	Proteinurie und/oder Hämaturie und/oder Leukozyturie

2.2 Studienprotokoll

Insgesamt wurden 86 Patienten mit akutem Nierenversagen in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen. Zusätzliche 15 gesunde Probanden dienten als Kontrollgruppe. Das Vorliegen jedweder kardiovaskulärer Erkrankung einschließlich Diabetes mellitus und arteriellem Hypertonus waren ebenso ein Ausschlusskriterium in dieser Gruppe wie das Vorliegen von Nierenerkrankungen. In der Gruppe der Patienten mit akutem Nierenversagen lag bei 46 (53,5%) der Betroffenen ein sogenanntes de-novo Nierenversagen vor. Das heißt, dass ein Neuauftreten dieses Krankheitsbildes ohne jegliche Nierenfunktionseinschränkung in der bisherigen Anamnese beobachtet wurde. Bei 40 (46,5%) Probanden lag bereits zu Untersuchungsbeginn ein chronisches Nierenversagen mit durchschnittlichen Kreatininwerten zwischen $1,4 \pm 0,8$ mg/dl vor (akut auf chronisches Nierenversagen). Alle weiteren Eigenschaften des Patientenkollektivs können Tabelle 4 bis 7 entnommen werden.

2.3 Messung von Calprotectin mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die durchschnittliche Calprotectinkonzentration im Urin wurde mittels eines kommerziellen enzymbasierten Immunoassay (ELISA)-Kit quantifiziert (PhiCal R Calprotectin Immundiagnostik AG, Benzheim, Deutschland).

ELISA beschreibt ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren. ELISA gehört zu der Gruppe sogenannter Immunoassay-Verfahren, die auf einer enzymatischen Farbreaktion basieren. Das nachzuweisende Antigen (in diesem Versuch humanes Calprotectin) wird über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden und somit angereichert. Ein Zweitantikörper (auch Detektionsantikörper genannt), der durch ein Enzym gekoppelt ist, führt letztendlich zu der Reaktion eines Farbstoffsubstrates. Die Bestimmung von Calprotectin im Urin erfolgte verblindet. Jede Probe aus 100 µl Urin (Verdünnung 1:10) wurde mit einem Antikörper gegen humanes Calprotectin (S100A8/S100A9 Heterodimer) inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C auf einem horizontalen Mixer wurden die Proben fünf Mal mit Pufferlösung gewaschen. Im Anschluss wurde ein sekundärer biotinierter monoklonaler Antikörper gegen antihumanes Calprotectin hinzugefügt. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde ein peroxidasehaltiges Extravidinkonjugat hinzugesetzt.

Es erfolgte im Anschluss eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur, dann wurde das überschüssige Konjugat mittels Waschung entfernt. Als Peroxidasesubstrat wurden 100 Mikroliter (µl) Tetramethylbenzidinlösung eingesetzt (20-minütige Inkubation in Dunkelheit unter Raumtemperatur). Abschließend wurde Schwefelsäurelösung (100µl) zur Reaktionsauslösung hinzugefügt. Die Aufnahme wurde bei 450 Nanometer (nm) gemessen, mit 620nm als Referenzwert. Für jede Probe wurden Doppelmessungen durchgeführt und der Mittelwert verwendet. Um die Ergebnisse in ein Verhältnis mit der jeweiligen Konzentration des Urins zu setzen, wurde Kreatinin in den Urinproben bestimmt und somit das Calprotectin/Kreatininverhältnis ermittelt.

2.4 Immunhistochemie von Nierenbiopsaten

Die Durchführung der Biopsie erfolgte nach dem klinischen Standard der Klinik für Nephrologie der Charité – Campus Benjamin Franklin. Mittels 4% Formaldehyds wurden die per Nadelbiopsie gewonnenen Nierenbiopsate fixiert und im Anschluss in Paraffin fixiert. Fünf Mikrometer (μm) dünne Schnittpräparate wurden erstellt, anhand derer die sogenannte PAS-Reaktion (Periodicacid-Schiff-Reaction) durchgeführt wurde. Diese Art der Färbung wird häufig zum Anfärben histologischer Präparate verwendet, die viele glykogenreiche Zellen besitzen, wie beispielsweise die Nephrone. Durch die Periodsäure kommt es zur Oxidation von Glycolgruppen zu Aldehydgruppen. Weitere Paraffinblöcke wurden erstellt, getrocknet und für zwei Minuten in 10mmol/l Citratpuffer mit einem pH von 6,0 gekocht.

Im Anschluss wurde eine Immunhistochemie mittels basischer Phosphatase antibasischer Phosphatasetechnik (APAAP-Technik) erstellt. Die lokale Calprotectinverteilung wurde mittels Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für ein Epitop auf dem S100A8/A9-Heterokomplex versehen, welches nicht auf den individuellen Untergruppen S100A8 (MRP8) der S100A9 (MRP9) exprimiert wird (Produktnummer: T-1023, BMA, biomedical, Augs, Schweiz).

Die Biopsien stammen von Patienten mit intrarenalem Nierenversagen. Bei einem Patient ließ sich keinerlei Nierenschädigung finden, so dass das Nierenversagen als prärenal gewertet wurde. Ein Patient mit schwerer Pyelonephritis (nicht dem Studienkollektiv zugehörig) wurde als Positivkontrolle genutzt.

2.5 Statistik

Die metrischen Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Bei einem positiven Ergebnis wurden die Daten als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt (Alter, body-mass-index/BMI, estimated glomerular filtration rate/eGFR, C-reaktives Protein/CRP, Kreatinin, Natrium, F_{ENa}). Nicht normalverteilte metrische Daten wurden als Median und Interquartilsabstand aufgezeigt (Calprotectin, Calprotectin/Kreatiniratio, Proteinurie). Die diagnostische Aussagekraft von Calprotectin im Urin wurde mittels Receiver operating characteristic (ROC)-Analyse durchgeführt. Die ROC-Kurven wurden zur Quantifizierung der Genauigkeit von Calprotectin, der Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens sowie zur Einschätzung des optimalen Grenzwertes von Calprotectin zur Differenzierung von prä- und intrarenalem akuten Nierenversagen eingesetzt. ROC-Analysen wurden ebenfalls zur Einschätzung der diagnostischen Performance von F_{ENa} und Proteinurie verwendet.

Außerdem wurden für den ermittelten Calprotectin-Trennwert die resultierende Sensitivität, Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert zur Identifizierung der intrarenalen Form errechnet. Unterschiede normalverteilter metrischer Daten zwischen zwei Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, unpaarigen T-Testes analysiert. Der Vergleich der nicht normalverteilten metrischen Daten erfolgte nichtparametrisch mittels Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich nominaler dichotomer Parameter zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Fisher's Exact Test durchgeführt (Anwesenheit/Abwesenheit von Begleiterkrankungen, Vormedikation, Biopsie, Geschlecht). Ordinale polychotome Daten wurden mittels Pearson-X-Test (Stadien des akuten Nierenversagens) verglichen. Die gesamte statistische Analyse und Darstellung wurde mit dem Statistikprogramm 18.0 (SPSS/ Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago/Illinois, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe, den Patienten mit prärenalem und intrarenalen akuten Nierenversagen bezogen bezogen auf die gesamte Studienpopulation

Das endgültige Patientenkollektiv der vorliegenden Studie betrug 101 Patienten. Davon hatten 86 Probanden ein akutes Nierenversagen. Die Kontrollgruppe bestand aus 15 gesunden Probanden. Das durchschnittliche Alter dieses Vergleichskollektivs betrug $33,8 \pm 10$ Jahre mit einem Durchschnitts-BMI von $23,4 \pm 3,6 \text{ kg/m}^2$. Das Serumkreatinin betrug im Durchschnitt $0,86 \pm 0,12 \text{ mg/dl}$ pro $1,73 \text{ m}^2$, entsprechend einer eGFR von $96,4 \pm 22,2 \text{ ml/min}$. Insgesamt gehörten der Gruppe neun männliche und sechs weibliche Probanden an. Die Klassifikation des akuten Nierenversagens erfolgte anhand der Ergebnisse durchgeführter Nierenbiopsien. In Fällen, in denen keine Biopsie erfolgt war, wurde anhand der Kriterien, die in Tabelle 3 dargestellt wurden, klassifiziert.

Die epidemiologischen Daten, das Stadium der Erkrankung und die Ursachen sind in Tabelle 4 bis 7 dargestellt. Des Weiteren werden Vorerkrankungen, Prämedikation, nierenspezifische Parameter und Calprotectinkonzentration der Patienten mit akutem Nierenversagen berücksichtigt.

Die numerischen Daten aus Tabelle 4 bis 7 sind sowohl als \pm der Standardabweichung im Falle einer Normalverteilung dargestellt sowie auch als Median und als Interquartilsabstand (Calprotectin, Calprotectin-/Kreatininratio, Proteinurie). Statistische Tests sind für die individuellen Parameter angewandt worden und werden im Statistikteil präsentiert. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ zeigt eine statistische Signifikanz an.

Tabelle 4 zeigt die epidemiologischen Daten bezogen auf die gesamte Studienpopulation. Es wurden signifikant mehr Männer als Frauen eingeschlossen ($p=0,001$). Im Vergleich beider Gruppen mit prärenalem und intrarenalem akuten Nierenversagen konnten bezogen auf Alter, Body Mass Index und chronisch vorbestehenden Nierenerkrankungen statistisch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ($p>0,05$). In Fällen mit intrarenaler Form des Nierenversagens war häufiger eine Nierenbiopsie durchgeführt worden.

Tabelle 4: Studienpopulation bezogen auf die Epidemiologie.

Epidemiologie	Prärenal (n=34)	Intrarenal (n=52)	P
Frauen	6 (17,6%)	27 (51,9%)	0,001
Männer	28 (82,4%)	25 (48,1%)	
Alter (in Jahren)	68,4 ± 14,1	70,5 ± 16,5	0,53
Body Mass Index (kg/m ²)	26,4 ± 4,9	26,1 ± 4,5	0,76
Präexistente Nierenerkrankung	14 (41,2%)	26 (50%)	0,51
Nierenbiopsie	1 (2,9%)	8 (15,4%)	0,08

Aus Tabelle 5 können die jeweiligen Ursachen des akuten Nierenversagens entnommen werden. Die häufigste Ursache der prärenalen Form stellt die Dehydratation aufgrund von Gastroenteritis dar bzw. nachfolgend das medikamenteninduzierte hämodynamische akute Nierenversagen durch Diuretika, ACE-Hemmer (Angiotensin Converting Enzyme Hemmer) und NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika). Diese beiden Ursachen stellten zwei Drittel aller Fälle des prärenalen akuten Nierenversagens (siehe Tabelle 5 und 6) dar. Das restliche Drittel wurde durch verschiedene Formen der Dehydratation sowie kurzfristiger hypotensiver Reaktionen, hepatorener bzw. kardiorener Syndrome sowie bilateraler Nierenarterienstenosen verursacht. Die häufigste Ursache des intrarenalen Typs stellten schwere Harnwegsinfektionen und nachfolgend Glomerulonephritiden dar sowie akute Tubulusnekrosen, kontrastmittelinduziertes Nierenversagen, interstitielle Nephritis, Niereninfarkte, thrombotisch/thrombozytopenische Purpura (TTP), Rhabdomyolyse und das Vorliegen eines multiplen Myeloms (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Ursachen eines akuten Nierenversagens bezogen auf die vorliegende Studienpopulation.

Ursachen des ANV	Prärenal (n=34)	Intrarenal (n=52)
Dehydratation bei Gastroenteritis	12 (35,3%)	
Hämodynamisch, medikamenteninduziert (Diuretika, ACE-Hemmer, NSAR)	11 (32,4%)	
Andere Ursachen einer Dehydratation	5 (14,7%)	
Kardiorenale Syndrome	2 (5,9%)	
Hepatorenale Syndrome	1 (2,9%)	
Beidseitige Nierenarterienstenose	1 (2,9%)	
Kurzzeitige Hypotension	2 (5,9%)	
Hypoton-induzierte akute Tubulusnekrose		4 (7,7%)
Akute toxische Tubulusnekrose		2 (3,8%)
Halbmondförmige Glomerulonephritis		3 (5,8%)
Lupusnephritis		2 (3,8%)
Andere Formen der Glomerulonephritis		4 (7,7%)
Thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP)		1 (1,9%)
Medikamenteninduzierte akute interstitielle Nephritis		3 (5,8%)
renaler Infarkt		1 (1,9%)
Rhabdomyolyse		1 (1,9%)
Urosepsis/ schwere Harnwegsinfekte		22 (42,3%)
Kontrastmittelinduziert		3 (5,8%)
Multiplles Myelom		1 (1,9%)
Keine Ursache gefunden		5 (9,6%)

Die häufigsten Begleiterkrankungen sind in Tabelle 6 dargestellt. Eingenommene Medikamente bei stationärer Aufnahme wie ACE-Hemmer, Angiotensinrezeptorblocker (ARB) und Diuretika wurden in der Statistik miterfasst, da sie einen nachgewiesenen Einfluss auf die GFR ausüben. In der Gruppe des prärenalen akuten Nierenversagens konnten keine Harnwegsinfekte nachgewiesen werden, hingegen in der Gruppe der intrarenalen Form 23 Patienten einen Harnwegsinfekt diagnostiziert bekamen.

Probanden mit prärenalem Typ waren häufiger mit ACE-Hemmern (Angiotensin-Converting-Enzyme) oder Angiotensinrezeptorblockern (ARB) vortherapiert (Tabelle 6). Dieser Trend erreichte formal keine Signifikanz ($p=0,07$). Allerdings war die Einnahme von Diuretika in dieser Patientengruppe deutlich häufiger ($p=0,04$). Bezogen auf Diabetes mellitus und arteriellen Hypertonus konnten statistisch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ($p>0,05$).

Tabelle 6: Häufigste Begleiterkrankungen sowie Medikation bei stationärer Aufnahme.

Begleiterkrankungen	Prärenal (n=34)	Intrarenal (n=52)	P
Diabetes mellitus	10 (29,4%)	15 (28,8%)	1
Hypertonus	29 (85,3%)	36 (69,2%)	0,12
Harnwegsinfekte	0 (0%)	23 (44,2%)	< 0,001
Medikation bei Aufnahme			
ACE-Hemmer/ ARB	19 (55,9%)	17 (32,7%)	0,07
Diuretika	23 (67,6%)	22 (42,3%)	0,04

Wie in Tabelle 7 dargestellt, unterschieden sich die Werte von Kreatinin und eGFR bei Aufnahme nicht ($p=0,55$, $p=0,52$). Die Ergebnisse der Kreatininmessung bei Entlassung aus dem Krankenhaus wiederum waren signifikant niedriger in der Gruppe mit prärenalem akuten Nierenversagen ($p=0,047$). Kreatinin vor Aufnahme konnte bei 60 von 86 Patienten bestimmt werden. Beide Untersuchungsgruppen unterschieden sich signifikant bezüglich der Schwere der Proteinurie. Diese war sechsmal höher in Fällen mit intrarenalem Typ ($p<0,001$). CRP, Kreatininkonzentration und Natriumausscheidung im Urin sowie die Serum-Natriumkonzentration zeigten ebenfalls keine relevanten Unterschiede (p jeweils $>0,05$). FE_{Na} zeigte tendenziell höhere Werte bei der intrarenalen Form, dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,10$). Die genauen Werte mit den dazugehörigen Laborparametern können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Entscheidende klinische Laborparameter zur Einschätzung eines akuten Nierenversagens.

Klinische Laborparameter	Prärenal (n=34)	Intrarenal (n=52)	P
eGFR bei Aufnahme (ml/min)	18,2 ± 9,9	19,9 ± 13,4	0,52
Kreatinin bei Aufnahme (mg/dl)	4,4 ± 2,7	4,1 ± 2,2	0,55
Kreatinin bei vorheriger Aufnahme (mg/dl)	1,4 ± 0,7	1,4 ± 0,8	0,88
Kreatininabfall (mg/dl)	1,7 ± 0,9	2,2 ± 1,6	0,047
Proteinurie (mg/l)	98 (66 – 178)	393 (167 – 1023)	<0,001
Proteinurie (mg/l)/Kreatinin im Urin (g/l)	165 (75 – 309)	987 (295 – 2071)	<0,001
C-reaktives Protein (mg/dl)	5,2 ± 4,6	6,7 ± 9,7	0,4
Kreatinin im Urin (g/l)	0,71 ± 0,32	0,61 ± 0,38	0,23
Natrium im Urin (mmol/l)	67,0 ± 32,4	67,5 ± 39,4	0,95
Serum- Natrium (mmol/l)	137,6 ± 4,5	137,4 ± 5,5	0,9
Natriumexkretion (%) FE _{Na}	3,5 ± 2,5	5,2 ± 6,5	0,1
Calprotectin im Urin (ng/ml)	28 (13 – 73)	1692 (765 – 4735)	<0,001
Calprotectin im Urin (ng/ml)/ Kreatinin im Urin (g/l) Ratio	52 (23 – 123)	3698 (1330 – 7812)	<0,001

Sowohl in der Gruppe des prärenalen akuten Nierenversagens als auch in der Gruppe der intrarenalen Form lag in der Mehrzahl der Fälle das Stadium 3 nach AKIN vor, gefolgt von Stadium 2 und 1 (siehe Tabelle 8). Die Schwere der Erkrankung gemessen anhand der AKIN-Kriterien unterschied sich nicht signifikant in beiden Untersuchungsgruppen ($p=0,82$). Der Zeitraum zwischen dem Maximalwert des Serumkreatinins und den Ergebnissen der Urinprobe lag zwischen 3,2+- 3,7 Tagen. Die Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach AKIN sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 8: Einteilung des prärenalem und intrarenalen akuten Nierenversagen entsprechend der AKIN-Kriterien bezogen auf die vorliegende Studienpopulation.

	Prärenal (n=34)			Intrarenal (n=52)		
	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3
Anzahl der Probanden	7 (20,6%)	9 (26,5%)	18 (52,9)	13 (25%)	15 (28,8%)	24 (46,2%)
eGFR bei Aufnahme (ml/min) auf 1,73m ²	29 (16-35)	21 (19-31)	10 (8-14)	28 (18-48)	19 (15-19)	10 (7-17)
Kreatinin bei Aufnahme (mg/dl)	2,3 (1,6-3,7)	3,0 (2,5-3,1)	5,2 (4,4-7,2)	2,2 (1,4-3,1)	3,2 (2,1-4,0)	5,8 (3,7-6,9)
Kreatinin bei vorheriger Aufname (mg/dl)	1,6 (1,0-2,3)	1,1 (1,0-1,3)	1,1 (1,0-2,3)	1,1 (0,8-1,5)	1,3 (0,9-1,8)	1,1 (1,0-1,7)
Kreatinin bei Entlassung (mg/dl)	1,8 (1,4-2,1)	1,1 (1,0-1,3)	1,3 (1,1-1,8)	1,3 (1,0-1,8)	1,5 (1,1-2,3)	1,9 (1,3-3,8)

3.2 Individuelle Messergebnisse der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio einer gesunden Kontrollgruppe, der Patienten mit prärenalem und intrarenalen akuten Nierenversagen bezogen auf die gesamte Studienpopulation

Die Calprotectinkonzentration konnte beim gesamten Studienkollektiv bestimmt werden. In der Abbildung 8 sind die einzelnen Ergebnisse der Calprotectinmessungen für jede der drei Gruppen des Patientenkollektivs einzeln grafisch dargestellt. Das Wertespektrum der erhobenen Calprotectinwerte reicht von 0-20400ng/ml. Um gleichzeitig die jeweilige Urinkonzentration mit in die Berechnung einzubeziehen, wurde Kreatinin im Urin bestimmt und so eine Calprotectin-/Kreatininratio (Abbildung 9) gebildet. Diese zusätzliche Auswertung soll einen möglichen Einfluss der Urinkonzentration auf die Calprotectinwerte untersuchen. Das Wertespektrum dieser Messungen reicht von 0-112710 (ng/ml)/(g/l). Die Messergebnisse werden als Median mit Interquartilsabständen angegeben.

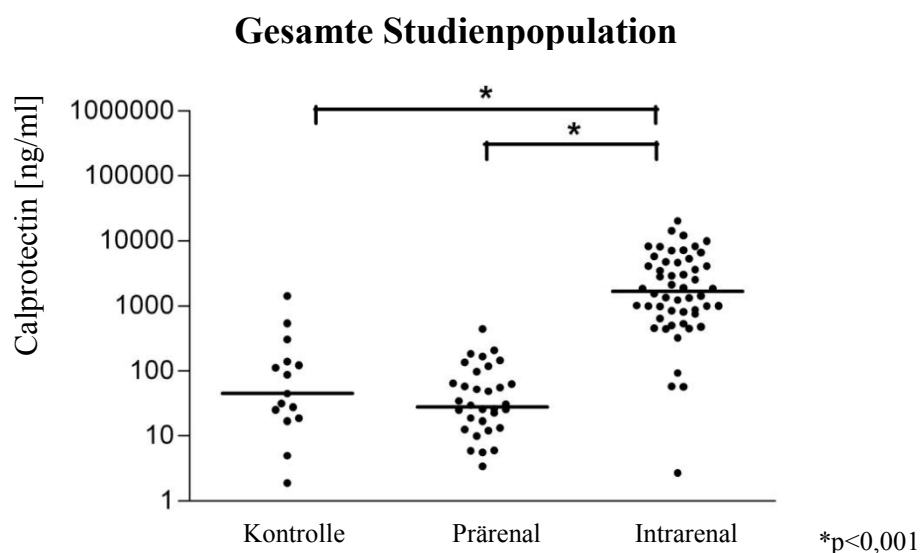


Abbildung 8: Calprotectinkonzentrationen der gesamten Studienpopulation. Dot-Plot Darstellung mit logarithmischer Y-Achse; Median dargestellt als horizontale Linien.

Der Median der Calprotectinkonzentration der gesunden Kontrollgruppe (44,8ng/ml, Interquartilsabstand 18,7-138,9ng/ml) unterschied sich nicht signifikant im Vergleich zur Gruppe mit prärenalem akuten Nierenversagen (27,9ng/ml, Interquartilsabstand 12,5-73,2ng/ml, $p=0,25$).

Im Gegensatz zu den annähernd gleichen Messresultaten der beiden Gruppen, welche auf der linken Seite der Abbildung 7 dargestellt sind, ergaben sich für den Median der Calprotectinkonzentration des Patientenkollektivs mit intrarenaler Form des akuten Nierenversagens um 60,7fach höhere Werte (1692,2ng/ml, Interquartilsabstand 765,4-4734,6ng/ml) als bei einem prärenalem akuten Nierenversagen.

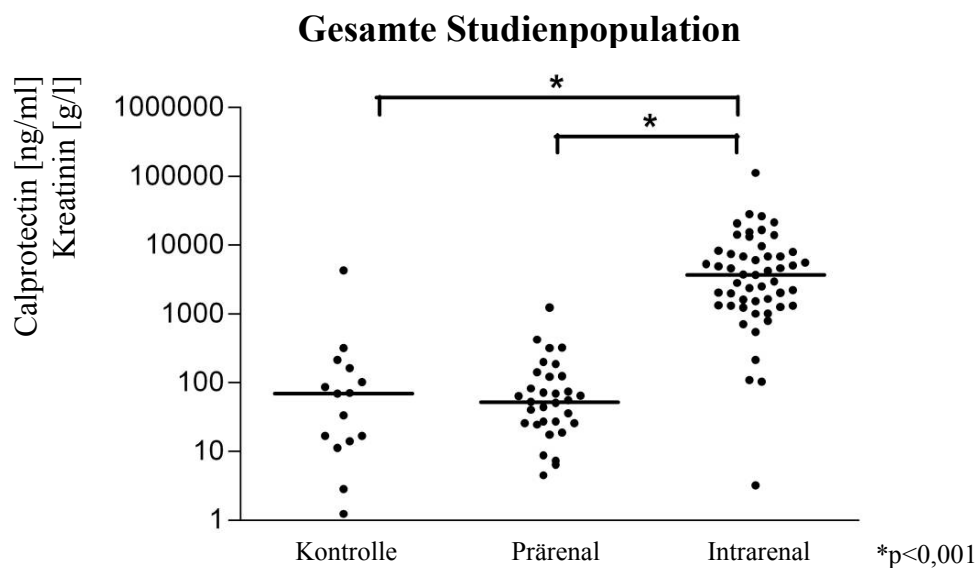


Abbildung 9: Ratio der Konzentrationen von Calprotectin und Kreatinin im Urin in der gesamten Studienpopulation. Dot-Plot Darstellung mit logarithmischer Y-Achse; Median dargestellt als horizontale Linien.

Die Calprotectin-/Kreatinin Ratio der gesunden Kontrollgruppe (69,5(ng/ml)/(g/l), Interquartilsabstand 14,2-162,3(ng/ml)/(g/l)) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zu der Gruppe mit prärenalem akutem Nierenversagen (52,0 (ng/ml)/(g/l), Interquartilsabstand 23,3-123,4(ng/ml)/(g/l), $p=0,97$). Das Calprotectin-/Kreatininverhältnis bei der intrarenalen Form lag jedoch um das 71,1fache über den Werten der Probanden mit prärenalem Typ ($p<0,001$).

Sowohl die Calprotectinkonzentration als auch das Calprotectin-/Kreatininverhältnis in der Gruppe mit intrarenalem akuten Nierenversagen waren demnach signifikant höher als das der gesunden Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,001$).

Die Urinkonzentration scheint nach Abschluss der Untersuchungen kein Einflusskriterium zu sein, welches die Aussagekraft der jeweiligen Calprotectinmessungen beeinflusst. Dies gilt sowohl für die gesunde Kontrollgruppe, als auch für das prärenal erkrankte Patientenkollektiv im Verhältnis zur intrinsischen Form des akuten Nierenversagens.

3.3 Individuelle Messergebnisse der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio der gesunden Kontrollgruppe, des prärenalen und des intrarenalen akuten Nierenversagens bezogen auf die gesamte Studienpopulation nach Ausschluss eines HWI

Aufgrund der durch HWI verursachten Leukozyturie, welche als Folgeerscheinung möglicherweise eine erhöhte Calprotectinkonzentration im Urin verursachen kann, wurden alle nachgewiesenen Fälle von Infekten der ableitenden Harnwege in einer zweiten Analyse des Studienkollektivs ausgeschlossen. In der Untersuchungsgruppe mit prärenalem Typ wurden keine Fälle von Infektionen der ableitenden Harnwege gefunden. Die gesunde Kontrollgruppe wurde im Vorfeld nicht auf das Vorhandensein eines HWIs getestet. Dementsprechend blieben die Werte der Calprotectinkonzentration sowie der Calprotectin-/Kreatininratio für dieses Kollektiv unverändert.

Die Daten dieser bereinigten Analyse sind in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Sie belegen, dass durch den Ausschluss der intrinsischen Fälle mit einem HWI keine qualitativen Veränderungen der Ergebnisse des Gesamtkollektivs festzustellen waren. Die Calprotectinkonzentration im Urin überstieg in der Gruppe mit intrarenaler Form (1007,1ng/ml, Interquartilsabstand 465,0 - 2675,4 ng/ml) die Ergebnisse der Gruppe mit prärenalem akuten Nierenversagen ($p < 0,001$) ebenfalls signifikant. Gemäß der Messergebnisse um das 36,1fache.

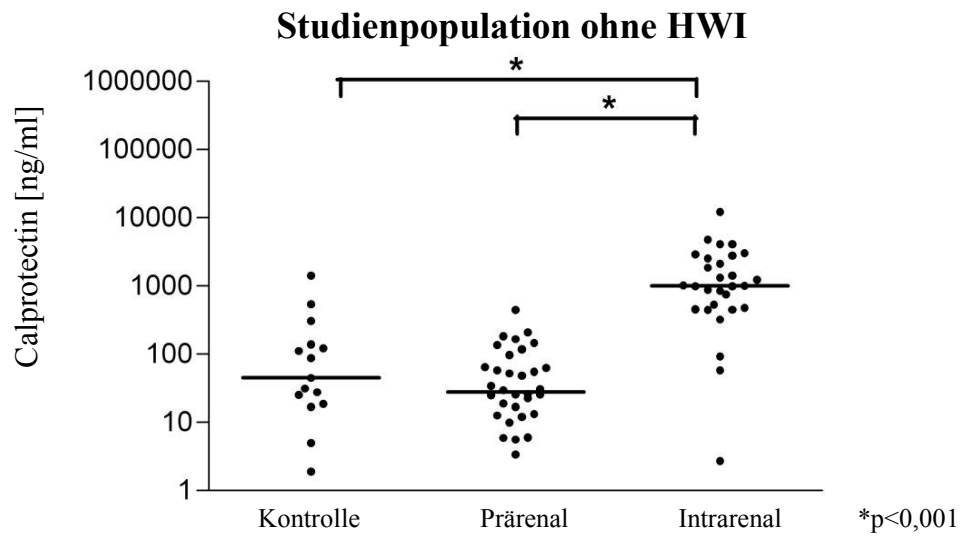


Abbildung 10: Calprotectinkonzentrationen im Urin in der Studienpopulation ohne Harnwegsinfektion. Dot-Plot Darstellung mit logarithmischer Y-Achse; Median dargestellt als horizontale Linien.

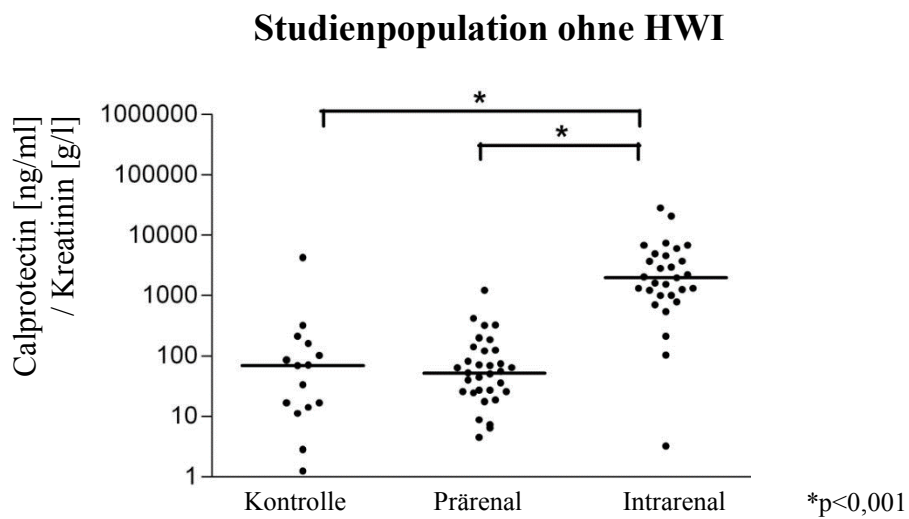


Abbildung 11: Calprotectin-/Kreatininratio in der Studienpopulation ohne Harnwegsinfektion. Dot-Plot Darstellung mit logarithmischer Y-Achse; Median dargestellt als horizontale Linien.

Das Calprotectin-/Kreatininverhältnis bei der intrarenalen Form (1987 (ng/ml)/(g/L), Interquartilsabstand 1009 - 4744(ng/ml)/(g/L)) zeigt keinen qualitativen Unterschied zu den bisherigen Auswertungen, da bei den Probanden mit intrarenalem Typ ($p < 0,001$) die Messwerte um das 38,2 fache höher lagen, als bei der prärenalen Gruppe.

3.4 Diagnostische Genauigkeit von Calprotectin im Urin zur Abschätzung eines intrarenalen akuten Nierenversagens mittels ROC-Analysen

Die diagnostische Genauigkeit zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch Calprotectin wurde mittels ROC-Kurven untersucht. Die ROC-Analyse der Calprotectinkonzentration im Urin (Abbildung 12) zeigt einen area-under-the-curve-Wert (AUC) von 0,97 an. Die Calprotectin/Kreatininratio ergab ebenfalls einen AUC-Wert von 0,97 (Abbildung 13).

Nach Ausschluss aller Fälle von HWI betrug die AUC der ROC-Kurve 0,95 für die Calprotectinkonzentration (Abbildung 14) im Urin und 0,95 für das Calprotectin-/Kreatininverhältnis (Abbildung 15).

Proteinurie (Abbildung 17) zeigt eine höhere diagnostische Genauigkeit (AUC 0,82) als die in Abbildung 16 dargestellte FE_{Na} (AUC 0,52). In beiden Fällen lag jedoch eine geringere diagnostische Genauigkeit als bei Calprotectin im Urin (AUC 0,97) und der Calprotectin-/Kreatininratio (AUC 0,97) vor (Abbildungen 12 und 13).

Calprotectin im Urin

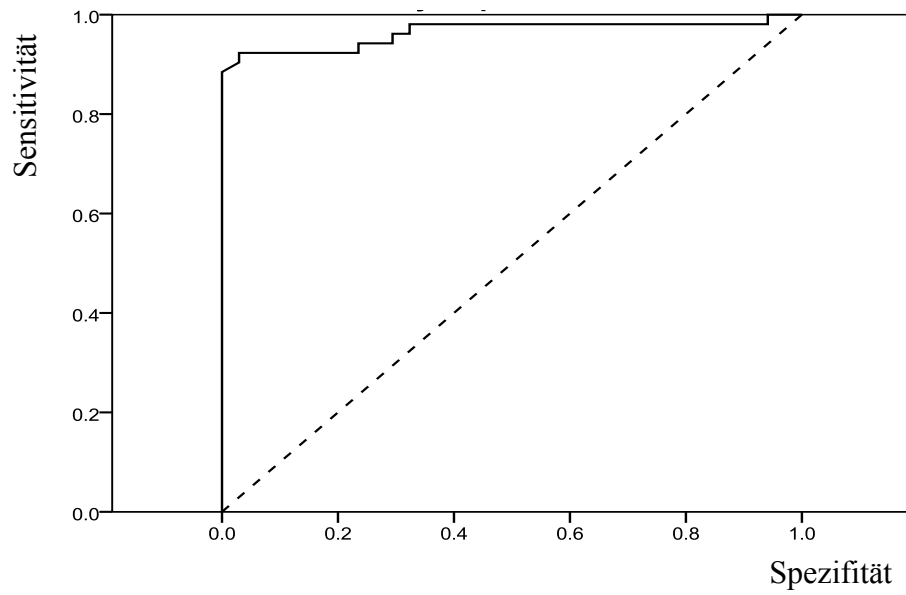


Abbildung 12: ROC Analyse von Calprotectin im Urin zur Diagnostik eines intrarenalen akuten Nierenversagens (AUC 0,97).

Calprotectin/Kreatinin im Urin

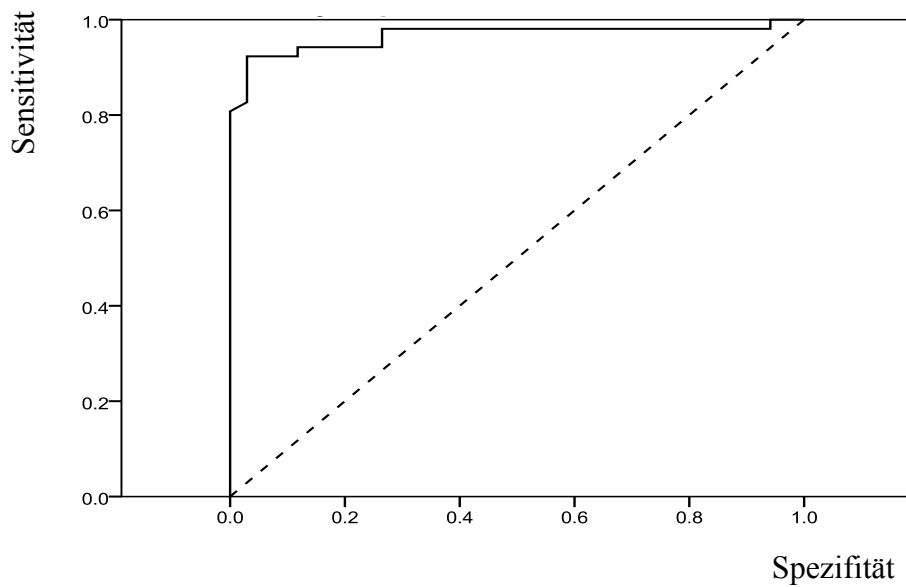


Abbildung 13: ROC-Analyse der Calprotectin/Kreatininratio im Urin zur Diagnose eines intrarenalen akuten Nierenversagens (AUC 0,97).

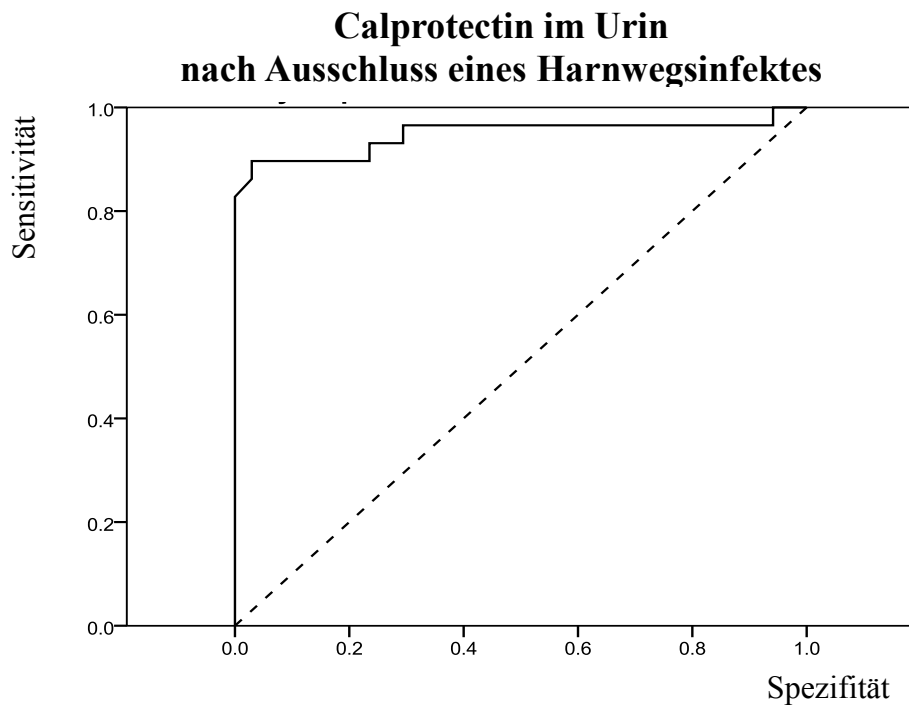


Abbildung 14: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch Calprotectin im Urin in der Studienpopulation ohne Harnwegsinfektion (AUC 0,95).

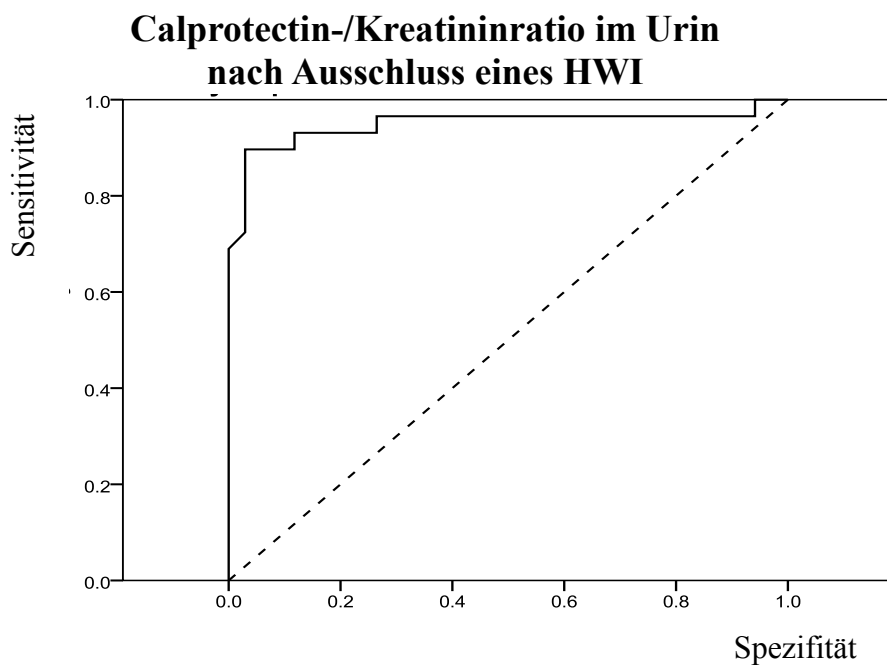


Abbildung 15: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch die Calprotectin-/Kreatininratio im Urin in der Studienpopulation ohne Harnwegsinfektion (AUC 0,95).

Fraktionelle Natriumexkretion

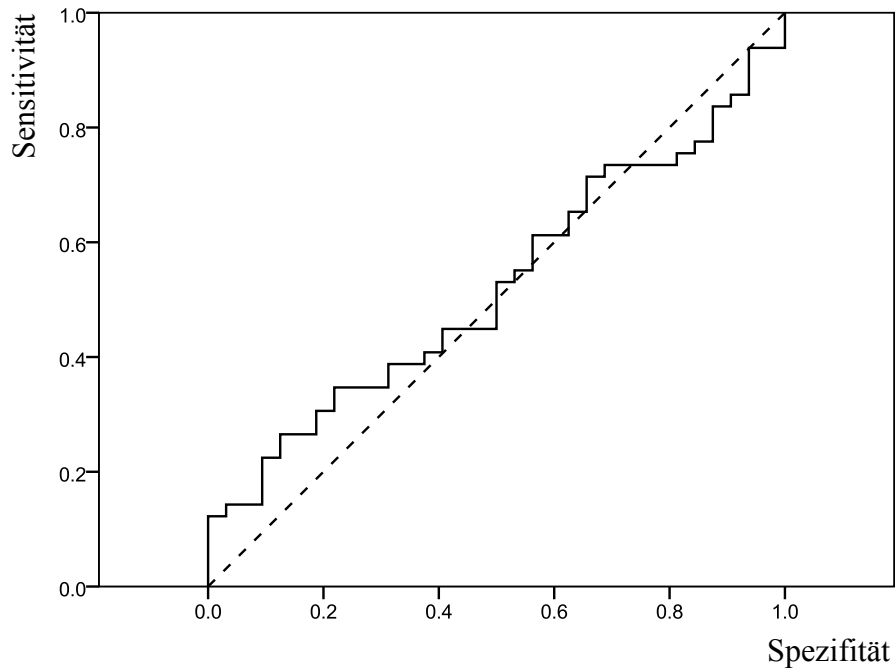


Abbildung 16: ROC Analyse zur Identifizierung eines intrarenalen Nierenversagens durch die fraktionelle Natriumausscheidung FE_{Na} (AUC 0,52).

Proteinurie

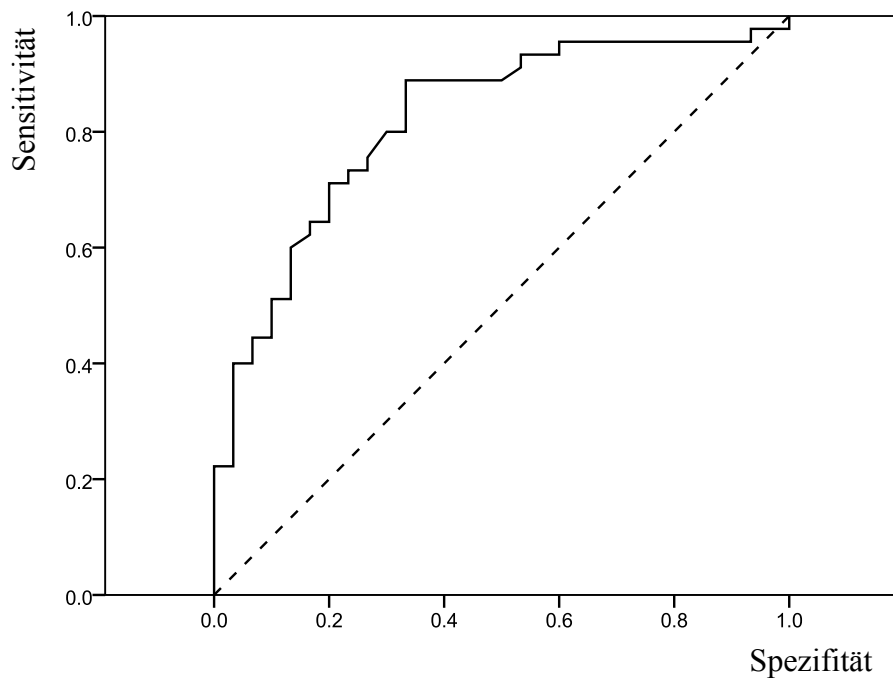


Abbildung 17: ROC Analyse zur Identifizierung eines akuten intrarenalen Nierenversagens durch die Proteinurie (AUC 0,82).

ROC-Analysen wurden zur Identifizierung eines optimalen Normwerts zur Abgrenzung zwischen prärenalem und intrarenalen akuten Nierenversagen angewandt. Wie in Tabelle 9 dargestellt, erreichte Calprotectin im Urin eine Sensitivität von 92,3% und eine Spezifität von 97,1% für einen Grenzwert von 300ng/ml. Abbildung 17 zeigt ein Flussdiagramm bezogen auf den Grenzwert von 300ng/ml. Eingeschlossen ist die gesamte Studienpopulation. Zu entnehmen ist die Genauigkeit sowie die Zuordnung der Teilnehmer zu einem prärenalem und intrarenalem akuten Nierenversagen.

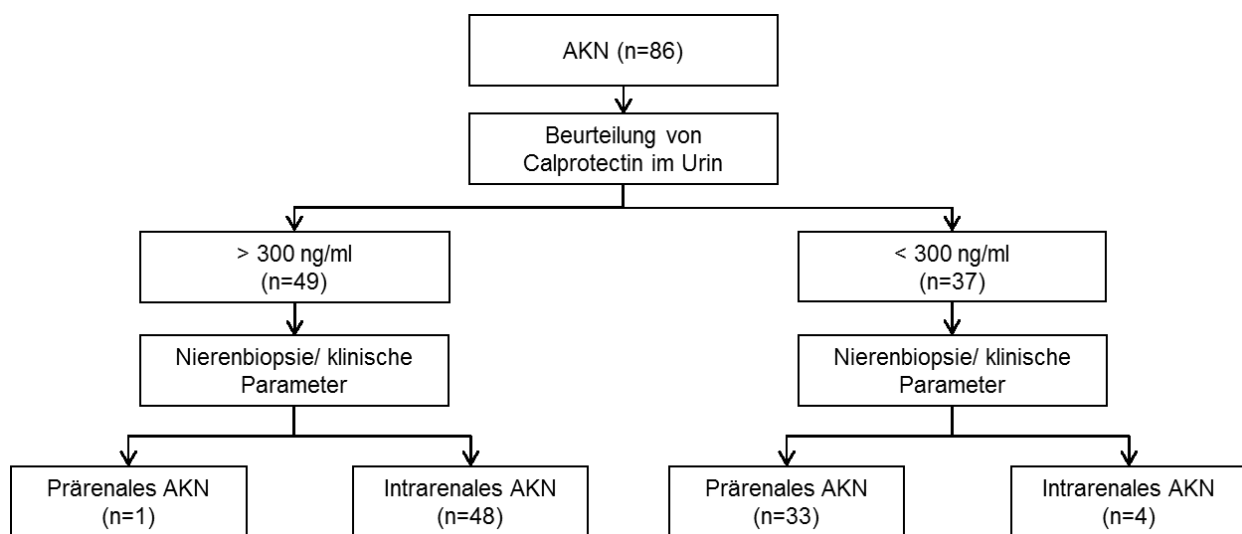


Abbildung 18: Diagnostische Performance von Calprotectin im Urin mit einem Grenzwert von 300ng/ml für die Einteilung eines prärenalem und intrarenalem akuten Nierenversagens.

Die daraus resultierenden positiven bzw. negativen prädiktiven Werte betragen 98,0% bzw. 89,2%. Die Calprotectin-/Kreatininratio erreichte vergleichbar hohe Werte mit einem Grenzwert von 500 (ng/ml)/(g/l). Nach Ausschluss aller Fälle mit HWI, zeigten die ROC-Kurven einen AUC von 0,95 für Calprotectin und 0,95 für die Calprotectin-/Kreatininratio. Die Spezifität betrug 97,1% und die Sensitivität zeigte einen leichten Abfall auf 89,7% für beide Parameter. Gleichzeitig sank der positive prädiktive Wert leicht auf 96,3%, wobei der negative prädiktive Wert gleichzeitig auf 91,7% anstieg.

Tabelle 9: Darstellung der Calprotectinkonzentration im Urin und der Calprotectin-/Kreatininratio zur Ermittlung eines intrarenalen akuten Nierenversagens bezogen auf die vorliegende Studie. Die Darstellung zeigt die Studienpopulation mit und ohne Vorliegen eines HWI.

	Gesamte Studienpopulation		Gesamte Studienpopulation nach Ausschluss eines Harnwegsinfektes	
	Calprotectin (ng/ml) (Grenze 300)	Calprotectin (ng/ml) / Kreatinin (g/l) (Grenze 500)	Calprotectin (ng/ml) (Grenze 300)	Calprotectin (ng/ml) / Kreatinin (g/l) (Grenze 500)
Sensitivität	92,3%	92,3%	89,7%	89,7%
Spezifität	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%
Positiver prädiktiver Wert	98,0%	98,0%	96,3%	96,3%
Negativer prädiktiver Wert	89,2%	89,2%	91,7%	91,7%

3.5 Immunhistochemie

Die immunhistologische Untersuchung der Nierenbiopsien mittels S100A8/A9-Antikörper zeigte positive Färbungen bei der intrarenalen Form des akuten Nierenversagens an. Exemplarisch ist in Abbildung 17C/D eine Lupusnephritis dargestellt. Im Falle eines prärenalen akuten Nierenversagens zeigten sich jedoch negative Ergebnisse. Die Pyelonephritis diente als Positivkontrolle und zeigte erwartungsgemäß stark positive Signale für Calprotectin. Abbildung 17 zeigt repräsentative Immunhistochemien eines intrarenalen Nierenversagens (Lupusnephritis, Abbildung 17C/D), eines prärenalen Nierenversagens (Abbildung 17E/F) sowie einer Pyelonephritis (Positivkontrolle, Abbildung 17A/B). Im Folgenden werden die Befunde in PAS-Färbung und nach Inkubation mit einem Antikörper gegen das S100A8/S100A9 Heterodimer beschrieben.

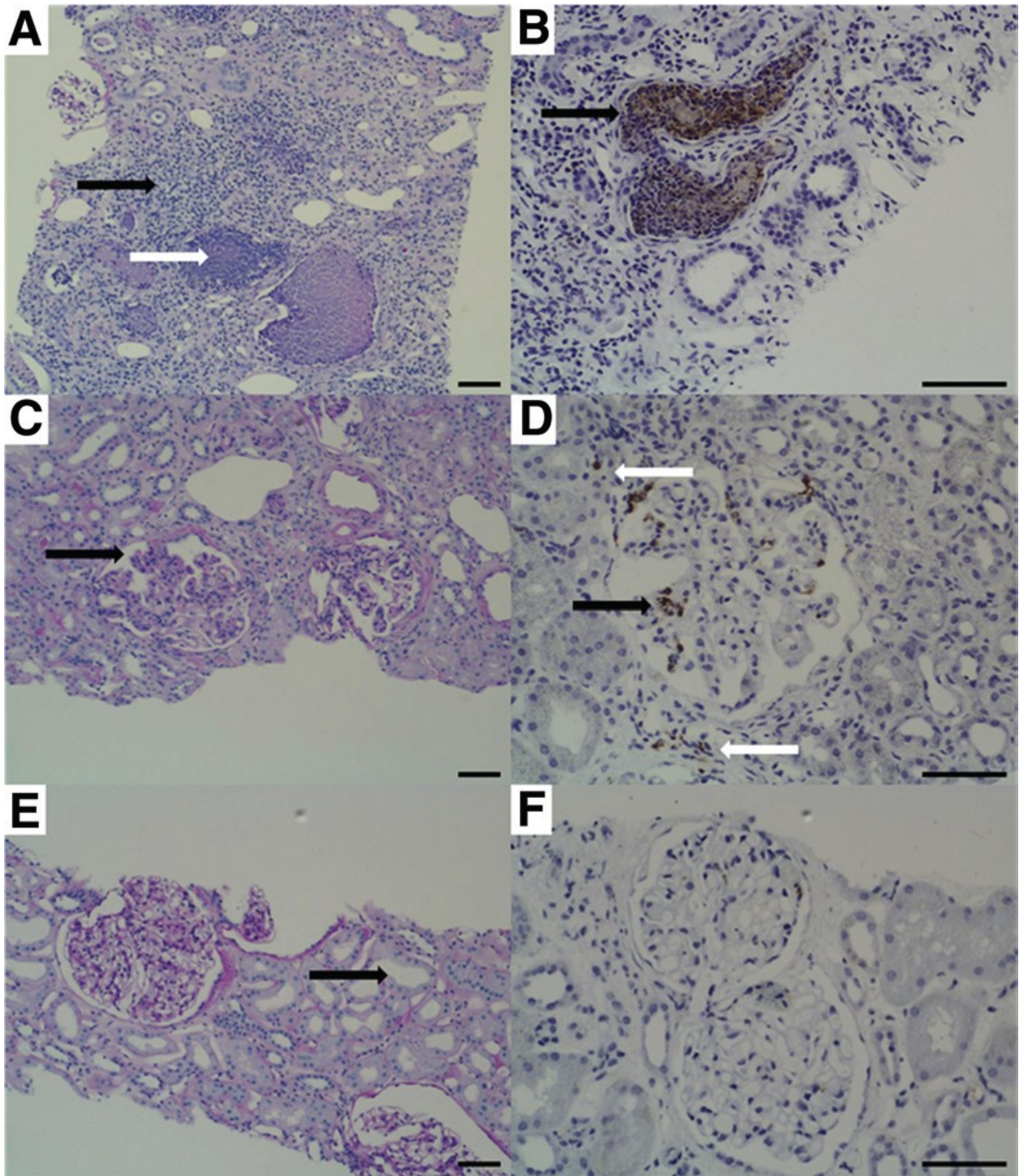


Abbildung 19: Histologien der Nierenbiopsien in PAS-Färbung (100fache Vergrößerung) und nach Inkubation mit einem Antikörper gegen S100A8/A9 (200fache Vergrößerung, braun) bei einer Pyelonephritis (A/B, Calprotectinkonzentration im Urin 8231,7ng/ml), bei einer Lupusnephritis (C/D, Calprotectinkonzentration im Urin 1422,2ng/ml) und einem Patienten, der die klinischen Kriterien eines prärenalen akuten Nierenversagens erfüllt (E/F, Calprotectinkonzentration im Urin 2,7ng/ml). Die Beschreibung der Befunde ist im Text unter Kapitel 3.3 aufgeführt (eigene Darstellung).

In der PAS-Färbung zeigten sich bei der Pyelonephritis eine tubulointerstitielle Nephritis mit polymorphkernigen Leukozyten (schwarzer Pfeil) und ein akuter Tubuluschaden mit einer dichten entzündlichen Infiltration (weißer Pfeil). Dies wird in Abbildung 19A dargestellt. Wie Abbildung 19B zeigt, kam es zu einer stark positiven Anfärbung von Calprotectin bei Vorhandensein von Neutrophilen in tubulären Mikroabszessen (schwarzer Pfeil).

Abbildung 19C präsentiert die PAS-Färbung einer Lupusnephritis und zeigt zwei Glomeruli mit milder mesangialer Hyperzellularität. Außerdem ist eine kleine segmentale Läsion mit endokapillärer Proliferation zu erkennen (schwarzer Pfeil). Der Tubulusschaden ist gering mit einer milden tubulären Atrophie. Die Calprotectinanfärbung bewirkte sowohl intraglomerulär (schwarzer Pfeil) als auch in geringem Ausmaß im Interstitium positive Signale (weißer Pfeil), wie in Abbildung 19D zu erkennen ist.

Die PAS-Färbung in der Nierenbiopsie erfüllt die klinischen Kriterien einer prärenalen Form und zeigt Glomeruli ohne histologische Auffälligkeiten. Das glomeruläre Büschel zeigt normale Zellen, die glomerulären Kapillaren stellen sich unauffällig dar. Man sieht diskrete tubuläre Verdickungen mit milder Erweiterung des tubulären Lumens (schwarzer Pfeil). Wie in Abbildung 19E und F zu sehen ist, war die Calprotectinanfärbung negativ.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie die vorliegenden Daten gezeigt haben, handelt es sich bei Calprotectin um einen vielversprechenden Marker in der Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens. Mit Hilfe der Calprotectinkonzentration im Urin ist eine Differenzierung zwischen einem prärenalen und einem intrarenalen Typ möglich. Zwar erwies sich die Proteinurie zur Vorhersage der Erkrankung als zuverlässiger im Vergleich zur Natriumexkretion FE_{Na} im Urin, jedoch schwächer als die Calprotectinkonzentration im Urin. Während die Calprotectinkonzentration im Urin von Patienten mit prärenalener Form der von gesunden Vergleichspersonen entspricht, sind die Werte bei einer intrarenalen Genese des akuten Nierenversagens um ein Vielfaches erhöht.

4.2 Einordnung in bestehende Diagnostik

Zur Einordnung der Ergebnisse hilft ein Blick in die Gastroenterologie. Hier ist die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl ein etabliertes Verfahren in der Diagnostik zur Differenzierung eines Colon irritabile von einer entzündlichen Darmerkrankung. Das Colon irritabile geht nicht mit einer Infiltration der Darmwand durch neutrophile Granulozyten einher. Daher finden sich in diesen Fällen normwertige bis lediglich leicht erhöhte Calprotectinkonzentrationen im Stuhl. Bei entzündlichen Darmerkrankungen hingegen liegt eine solche Infiltration vor und es findet sich eine erhöhte Anzahl von Leukozyten und damit auch von Calprotectin im Urin. Die Arbeitshypothese der aktuellen Studie beruhte auf der Annahme, dass sich dieses Prinzip bei der Untersuchung von Calprotectin im Urin auf die Niere übertragen ließe.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich beim prärenalen Typ ähnlich verhält wie beim Reizdarmsyndrom. Bei beiden Erkrankungen liegt jeweils ein funktionales Defizit der jeweils betroffenen Strukturen bei gleichzeitig intaktem Epithel vor. Dies führt zu niedrigen Calprotectinkonzentrationen sowohl im Stuhl als auch im Urin. Calprotectin bietet unterschiedliche Eigenschaften, die es zu einem geeigneten klinischen Marker machen.

Es zeigt die lokale Entzündungsreaktion zu einem Zeitpunkt an, an dem andere klinische Entzündungsmarker noch keinen Anstieg verzeichnen (z. B. CRP). Die Bestimmung im Urin hat gegenüber Blut den Vorteil, dass nicht das systemische Ausmaß einer bestehenden Entzündung, sondern isoliert das Inflammationsniveau des Zielorgans, der Niere, betrachtet werden kann. Urin lässt sich unkompliziert gewinnen und es bedarf keines invasiven Eingriffs, der mit weiteren Komplikationen einhergehen kann, wie bei einer Nierenbiopsie. Calprotectin besitzt eine hohe Stabilität und ist bis zu über einer Woche bei Raumtemperatur nachweisbar. Die Bestimmung erfolgt unkompliziert und kostengünstig mittels ELISA-Verfahren. Die vorliegenden Daten zeigen eine gute diagnostische Performance. Die Spezifität zur Diagnose eines intrarenalen Nierenversagens liegt bei 97,1% bei einer Sensitivität von 92,3%.

Die genannten Aspekte legen nahe, dass Calprotectin ein vielversprechendes Molekül in der klinischen Diagnostik darstellt: es ist stabil, zuverlässig, sensitiv, spezifisch und unkompliziert zu bestimmen.

4.3 Erklärungsmöglichkeiten

Die Zuverlässigkeit der Calprotectinkonzentration im Urin zur Diagnostik der intrarenalen Form war in der vorliegenden Untersuchung erheblich höher als bei den bis heute etablierten vergleichbaren diagnostischen Markern FE_{Na} oder der Proteinurie. Die niedrige Aussagekraft von FE_{Na} könnte durch den hohen Anteil an Patienten mit Diuretikaeannahme zu erklären sein (43,7%), da diese selbst beim Vorliegen eines prärenalen akuten Nierenversagens zu einer hohen Diurese führt. Pépin et al. haben sich in der Vergangenheit mit FE_{Na} unter Diuretikaeannahme beschäftigt und festgestellt, dass FE_{Na} bei Patienten ohne Einnahme entwässernder Medikamente über eine Sensitivität von 78% verfügt, unter Diuretikaeannahme jedoch nur 58%. Der hohe Prozentsatz an Probanden, die in dieser Studie Diuretika einnahmen, spiegelt jedoch realistisch die Situation im heutigen Klinikalltag wider. Die Inzidenz des intrarenalen Typs ist gerade bei Patienten im fortgeschrittenen Alter bei gleichzeitigem Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung sehr hoch [47]. Trotz der genannten Einschränkungen stellt FE_{Na} bis heute den Goldstandard der laborchemischen Diagnostik bei der Differenzierung des akuten Nierenversagens dar.

Als zuverlässigerer Marker als FE_{Na} zeigte sich in dieser Studie die Proteinurie, da diese völlig unabhängig von der Einnahme von Diuretika ist. Da Calprotectin in der vorliegenden Untersuchung mit einer Sensitivität von 92,3% und einer Spezifität von 97,1% eine sehr gute Zuverlässigkeit beweist, lässt es die prädiktive Aussagekraft von FE_{Na} in den Hintergrund treten, selbst bei Patienten, die keine Diuretika einnehmen.

Ein weiterer Aspekt, der diskutiert wurde, war die Rolle der Urinkonzentration als einen potentiellen Störfaktor. Daher wurde im Vorfeld von jedem Probanden die Kreatininkonzentration im Urin bestimmt und auf diesem Wege die Calprotectin-/Kreatininratio erstellt. Interessanterweise barg die Genauigkeit dieser Ratio keine Vorteile im Vergleich zur alleinigen Calprotectinkonzentration im Urin. Das Ausmaß der Urinkonzentration beeinflusste in keiner Weise die Genauigkeit der Calprotectinkonzentration im Urin. Die durchgeführten ROC-Analysen zeigten einen Optimalwert der Calprotectinkonzentration von 300ng/ml zur Differenzierung zwischen prärenal und intrarenaler Form. Dies ist vermutlich durch die sehr hohen Unterschiede (über 60fach) zwischen intrarenalem und prärenalem Nierenversagen zu erklären. Bei derart großen Unterschieden spielen Variationen der Urinkonzentration eine untergeordnete Rolle.

In der Gruppe mit prärenalem Typ wies lediglich einer der 34 Probanden eine höhere Calprotectinkonzentration auf. In der Gruppe des intrarenalen akuten Nierenversagens wurde bei 4 von 52 Patienten eine Calprotectinkonzentration unter 300ng/ml gemessen. Interessanterweise wurden zwei dieser Probanden aufgrund von grenzwertigen histologischen Befunden in die Gruppe des intrarenalen Typs klassifiziert.

Es gibt jedoch zwei Einschränkungen, die im Folgenden zu diskutieren sind: das Vorliegen eines HWI und die Menstruationsblutung. Wie bereits erläutert, wird Calprotectin im Zuge einer Entzündungsreaktion von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet. Das Vorhandensein eines HWI geht einher mit einer Leukozyturie. So erscheint es nur logisch, dass die Calprotectinkonzentration im Urin erhöht ist. Liegt ein HWI, sowohl mit gleichzeitiger Dehydratation als auch ohne, als Ursache für eine Nierenfunktionsverschlechterung vor, so wurden diese Fälle als prärenale Form gewertet. Aus diesem Grunde wurde beschlossen eine erneute Auswertung nach Ausschluss aller Fälle von HWI vorzunehmen.

Dabei zeigte die ROC-Kurve als Darstellung der diagnostischen Zuverlässigkeit der Calprotectinkonzentration im Urin nur einen minimalen Abfall (AUC von 0,97 auf 0,95). Der positive prädiktive Wert sank geringfügig von 98% auf 96,3%, während der negative prädiktive Wert sogar von 89,2% auf 91,7% stieg. Es zeigt sich also, dass das Vorhandensein von Infekten der ableitenden Harnwege nur einen geringen Einfluss auf die vorliegende Untersuchung hat.

In der gesunden Kontrollgruppe zeigten sich drei Probanden, bei denen ohne Vorbestehen einer Nierenerkrankung die Calprotectinkonzentration über 300ng/ml lag. Bei einem dieser Probanden lag sogar eine Konzentration von 1413ng/ml vor. All diese Personen waren Frauen, wohingegen alle männlichen Teilnehmer eine Calprotectinkonzentration unter 150ng/ml aufzeigten. Ein Erklärungsansatz könnte die bei Frauen häufig bestehende asymptomatische Bakteriurie sein, die Einfluss auf die Calprotectinkonzentration haben könnte. Eine weitere Überlegung stellt die potentielle Kontamination des Urins durch eine (peri-)menopausale Blutung dar. Sollte also eine Calprotectinkonzentration bei Frauen ohne Vorliegen einer Nierenerkrankung bestehen, so ist ein HWI oder eine Menstruationsblutung oder beides zunächst auszuschließen.

Für das Auftreten eines akuten Nierenversagens gibt es nicht nur einen Grund. Die Ursachen der intrarenalen Form sind vielfältig und beinhalten Glomerulonephritiden, Vaskulitiden, interstitielle Nephritiden und die akute tubuläre Nekrose. In vorliegender Studienpopulation waren alle der genannten Entitäten vertreten. Die Frage, ob ein einzelner Marker wie Calprotectin in adäquater Weise das gesamte Spektrum dieser verschiedenen Erkrankungen widerspiegeln kann, ist demnach berechtigt. Calprotectin gehört zu der Gruppe der DAMPs und wird vorwiegend von neutrophilen Granulozyten sezerniert. Befindet sich im Körper eine Entzündung, so agiert Calprotectin mit TLR4 als deren Ligand und setzt so eine Immunkaskade in Gang (siehe Abbildung 7). Calprotectin gehört zur angeborenen Immunabwehr.

Im Gegensatz zum adaptiven wird das angeborene Immunsystem sowohl von eindringenden Organismen als auch durch Gewebsverletzungen auf eine nicht spezifische Weise stimuliert. Genau diese Eigenschaft macht Calprotectin so interessant für die Diagnostik des Nierenversagens. TLR4 ist an der Pathogenese aller entzündlichen Nierenerkrankungen beteiligt, Glomerulonephritis, Vaskulitis und interstitieller Nephritis. Beim intrarenalen Typ verursacht der tubuläre Schaden eine sekundäre Aktivierung des angeborenen Immunsystems. TLR4 wird sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus exprimiert, ebenso im dünnen Anteil der Henleschen Schleife und dem Sammelbecken.

Bei ischämischer Reperfusion wird die Expression in diesen Arealen verstärkt [42]. Die immunhistologischen Ergebnisse mit dem S100A8/A9-Heterokomplex-Antikörper zeigten einen detaillierten Einblick in die lokale Ausschüttung von Calprotectin in der Niere.

Die Schlussfolgerung, dass die Calprotectinanfärbung starke Signale vor allem bei der Pyelonephritis zeigte, erscheint naheliegend und logisch (Abbildung 19B). Interessanterweise war Calprotectin bei der Lupusnephritis sowohl im Interstitium als auch im Glomerulum nachweisbar (Abbildung 19D). Es stellte sich außerdem eine segmentale Läsion mit endokapillärer Leukozytenproliferation dar, welche die intraglomeruläre Calprotectinanreicherung erklärt. Bei Patienten, die ein prärenales akutes Nierenversagen aufwiesen, war keine Calprotectinanfärbung nachweisbar (Abbildung 19F). Die Intensität des Calprotectinsignals und der Immunhistologie korrelierten ausgesprochen genau mit der Calprotectinkonzentration im Urin bei Werten über 800ng/ml (Pyelonephritis) und 1400ng/ml (Lupusnephritis) bzw. 300ng/ml (prärenale Form).

4.4 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie umfasste einen Zeitraum von Mai 2009 bis September 2010 mit insgesamt 101 Probanden. Um weitere und genauere Aussagen über Calprotectin im Urin als diagnostischen Marker zur Differenzierung eines akuten Nierenversagens treffen zu können, wäre es sinnvoll diesen Studientyp über einen längeren Zeitraum zu wiederholen. In dieser Studie war somit die Endzahl der Probanden begrenzt. Es lassen sich keine Aussagen über den Zeitverlauf der Ausschüttung von Calprotectin treffen. Die Frage, wie schnell Calprotectin ansteigt, bzw. wie schnell es wieder absinkt, bleibt aktuell unbeantwortet.

In Zukunft müsste weiterhin ein Augenmerk auf die Leukozyturie bei HWIs im Urin gelegt werden. Es ist bekannt, dass Harnwegsinfekte mit einer Leukozyturie einhergehen. Da Calprotectin von vorwiegend neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, ist es in erhöhter Konzentration im Urin messbar. Welchen Einfluss also hat diese Leukozyturie auf die gemessene Calprotectinkonzentration?

Um Calprotectin als diagnostischen Marker zu verstehen, wäre es sinnvoll den Mechanismus dieses Proteins besser zu kennen. Aktuell gibt es hierzu lediglich deskriptive Daten, warum Calprotectin beim intrarenalen Typ erhöhte Werte aufweist.

In dieser Studie wurde nicht beantwortet, ob Calprotectin bei Erkrankungen des Urothels Konzentrationsanstiege zeigt. Korreliert Calprotectin mit dem durch ein intrarenales akutes Nierenversagen hervorgerufenen Gewebeschaden? Stellt es einen Marker für die Aktivität, das heißt für die Schwere der Erkrankung dar?

Diese Thesen bieten weiterhin ein breites Spektrum zur Forschung und bleiben in dieser Studie unbeantwortet, liefern jedoch eine Grundlage für weitere, ausführliche Forschungsbestrebungen.

4.5 Calprotectin als diagnostischer Marker im klinischen Alltag

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eine hohe Sensitivität bzw. Spezifität von Calprotectin in der Differenzierung der verschiedenen Formen des Nierenversagens. Abbildung 20 beschreibt einen Vorschlag des differentialdiagnostischen Vorgehens unter Berücksichtigung von Calprotectin im klinischen Alltag.

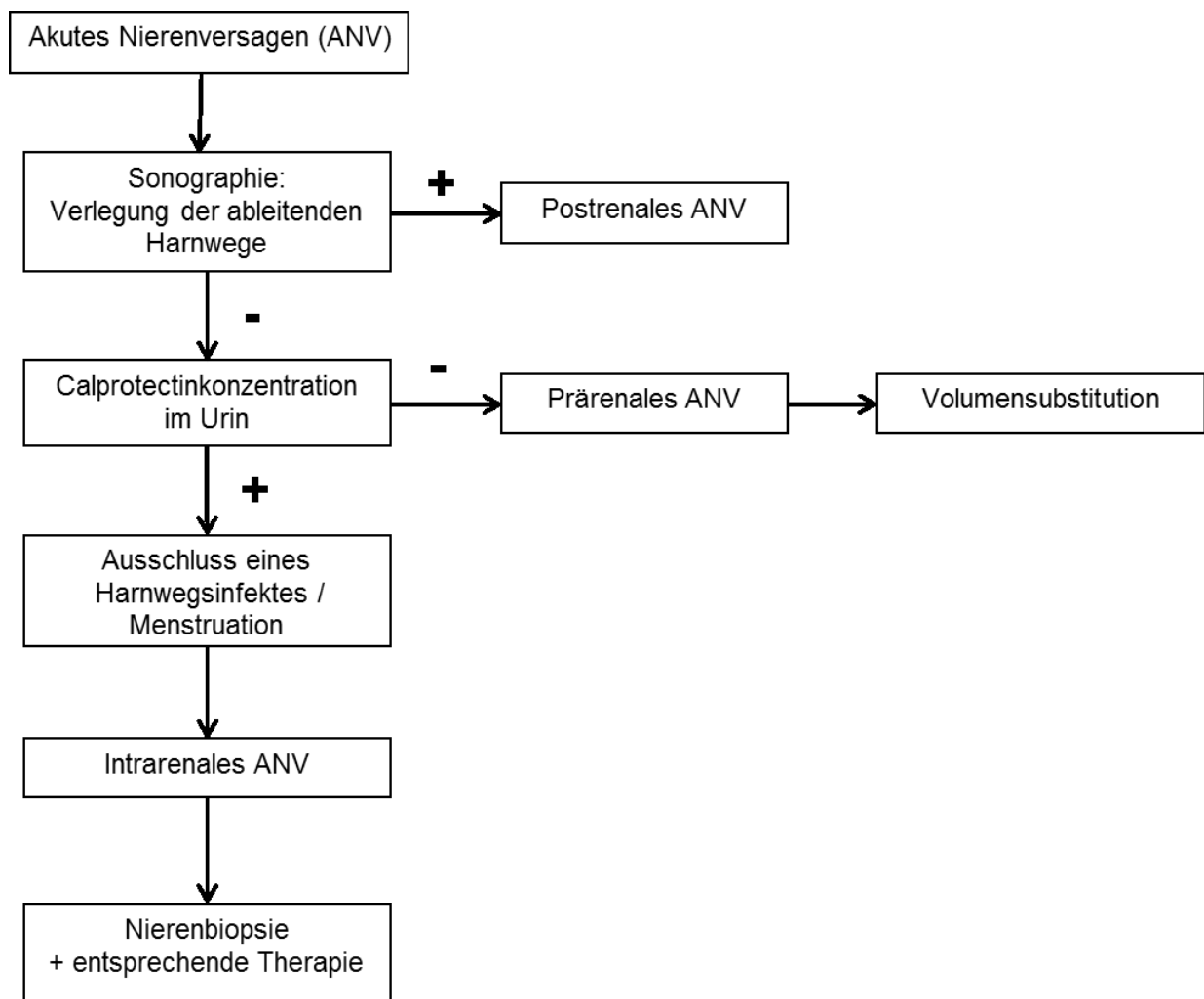


Abbildung 20: Vorschlag für einen Algorithmus zur Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens unter Anwendung von Calprotectin im klinischen Alltag (eigene Darstellung).

4.6 Möglicher zukünftiger Einsatz in der Klinik (Schnelltest)

In der Gastroenterologie ist Calprotectin bereits als quantitativer Schnelltest zur Bestimmung im Stuhl etabliert. Mit dieser Methode gelingt es, entzündliche Darmerkrankungen von dem nichtentzündlichen Reizdarmsyndrom zu unterscheiden. Innerhalb von Minuten kann so ein aussagekräftiges Ergebnis geliefert werden. Technisch und praktisch wäre es durchaus denkbar solch einen Schnelltest auch auf dem Gebiet der Nephrologie zu entwickeln. Dieser müsste zum Einsatz im Urin lediglich pH-adjustiert und bezüglich des Grenzwertes adaptiert werden. Da der Test in Form eines U-Stix vorliegen könnte, hieße das für Patienten mit einem akuten Nierenversagen, dass schnell, einfach und nichtinvasiv die Diagnose eines intrarenalen akuten Nierenversagens gestellt werden könnte. Diese Patienten ziehen einen großen Nutzen aus der folgenden Nierenbiopsie, da sofort mit der speziellen Therapie begonnen werden könnte und es keinen unnötigen Zeitverlust gäbe. Patienten hingegen, bei denen eine intrarenale Genese durch einen solchen Test ausgeschlossen werden kann, profitieren durch Wegfall einer Nierenbiopsie mit allen möglichen Komplikationen, die diese birgt. Eine Leukozyturie sollte stets als mögliche Ursache falsch-positiver Befunde ausgeschlossen werden.

4.7 Schlussfolgerungen

Calprotectin als diagnostischer Marker im Urin hat in der vorliegenden Studie eine hohe Sensitivität mit einer zusätzlich hohen Spezifität gezeigt (92,3% und 97,1%) und könnte damit potentielle Einsatzmöglichkeiten in der klinischen Differenzierung von prä- und intrarenalem akuten Nierenversagen finden. Die Calprotectinkonzentration bei Patienten mit prärenalem akuten Nierenversagen lag ähnlich hoch wie die gesunder Probanden. Bei Vorliegen eines intrarenalen Nierenversagens war die Konzentration hingegen auf das >60 fache erhöht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgender klinisch-diagnostischer Algorithmus für die Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens ableiten: Der erste Schritt ist die Sonographie der ableitenden Harnwege sowie der Niere selbst. Sie dient dem Ausschluss eines Abflusshindernisses. Im nächsten Schritt kann die Calprotectinkonzentration im Urin des Patienten bestimmt werden.

Liegt diese im Normbereich, also bei $\leq 300\text{ng/ml}$, so ist davon auszugehen, dass es sich um eine prärenale Genese handelt und es sollte mit der Volumensubstitution begonnen werden. Ist Calprotectin im Urin $>300\text{ ng/ml}$ erhöht, so sollte zunächst der Ausschluss eines HWI erfolgen. Bei Frauen sollte eine Zyklusanamnese erfragt werden.

Wurden diese beiden Faktoren ausgeschlossen, so zeigt Calprotectin im Urin mit hoher Wahrscheinlichkeit ein intrarenales akutes Nierenversagen an. Es sollten ggf. eine Biopsie sowie der schnellstmögliche Beginn der entsprechenden kausalen Therapie erfolgen. Durch dieses schnelle, einfache und ökonomische diagnostische Konzept könnte Zeit gewonnen werden, die für die effektive Therapie eines intrarenalen akuten Nierenversagens von großer Bedeutung ist. Ebenso können unnötige und invasive Biopsien bei Patienten mit prärenal Form vermieden werden.

5. Zusammenfassung

Bis heute gibt es keinen aussagekräftigen Laborparameter, der die Differenzierung eines prä- und intrarenalen akuten Nierenversagens zulässt. Calprotectin ist ein Heterodimer aus zwei Proteinen der S100 Familie (S100A8/S100A9). Es wird vornehmlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten produziert und ist ein Mediatorprotein des angeborenen Immunsystems.

In der vorliegenden Studie wurde bei 101 Probanden die Calprotectinkonzentration im Urin bestimmt. 86 Probanden hatten ein akutes Nierenversagen (34 prärenal, 52 intrarenal), 15 Probanden waren gesunde Kontrollen. Die Bestimmung von Calprotectin erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Einschlusskriterien waren das Vorliegen eines akuten Nierenversagens Stadium 1-3 nach AKIN-Kriterien. Eine postrenale Genese und ein Zustand nach Nierentransplantation wurden als Ausschlusskriterien definiert.

Bei einem intrarenalen Nierenversagen lag die Konzentration von Calprotectin im Urin im Median 60,7fach höher als bei einem prärenalen Nierenversagen (1692 ng/ml, Interquartilsabstand 765-4735 vs. 28 ng/ml, Interquartilsabstand 13-73, $p<0.001$). Die Konzentration bei prärenalem Nierenversagen unterschied sich nicht signifikant von gesunden Kontrollen (45 ng/ml, Interquartilsabstand 19-139, $p=0.25$).

Die Untersuchung der diagnostischen Performance mittels ROC-Kurven zeigte eine hohe Genauigkeit von Calprotectin (AUC, 0.97) in der Identifizierung eines intrarenalen akuten Nierenversagens. Die AUC der fraktionellen Natriumexkretion als traditionellem Labordiagnostikum für diese Fragestellung lag bei 0,52. Für einen Calprotectingrenzwert von 300 ng/ml lag die Sensitivität bei 92,3%, die Spezifität bei 97,1%, der positiv prädiktive Wert bei 98% und der negativ prädiktive Wert bei 89,2%.

Die Bestimmung des urinären Calprotectin/Kreatinin-Quotienten führte zu keiner Steigerung der Sensitivität und Spezifität. Die ELISA-Ergebnisse wurden mittels Immunhistochemie in Nierenbiopsien bestätigt. Färbungen mit einem Antikörper gegen das S100A8/S100A9 Heterodimer waren positiv bei einem intrarenalen akuten Nierenversagen und negativ bei einem prärenalen. Da Leukozyturien mit erhöhten Calprotectinkonzentrationen im Urin einhergehen, wurden alle statistischen Analysen nach Ausschluss aller Patienten mit Harnwegsinfekt wiederholt. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der diagnostischen Performance.

Calprotectin ist somit ein vielversprechender diagnostischer Marker zur Differenzierung eines prä- und intrarenalen Nierenversagens. Während das prärenale Nierenversagen zu keinem Anstieg des urinären Calprotectins gegenüber Gesunden führt, geht das intrarenale Nierenversagen mit einer Steigerung der Konzentration um ein Vielfaches einher.

6. Literaturverzeichnis

- 1) **Herold G:** „*Innere Medizin*“; Gerd Herold, Köln, 2006; 546-547.
- 2) **Mehta RL, Vellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A:** „*Acute Kidney Injury Network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.*“; Crit Care, 2007; 11: R31.
- 3) **Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW:** „*Acute kidney injury, mortality, length of stay and costs in hospitalized patients.*“ J Am Soc Nephrol, 2005; 16: 3365-70.
- 4) **Keller CK, Geberth SK:** „*Akutes Nierenversagen.*“ Praxis der Nephrologie; Springer Berlin, Heidelberg, 2010; 181-198.
- 5) **Herget-Rosenthal S, Langenbeck M:** „*Das akute Nierenversagen-eine häufig unterschätzte Erkrankung.*“ Dialyse aktuell; 2010; 14(3):136.
- 6) **Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmelfarb J, Collins AJ:** „*Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992-2001.*“; J AM Soc Nephrol, 2006; 17: 1135-1142.
- 7) **Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS:** „*Harrison Prinzipien der Inneren Medizin*“; McGraw-Hill, New York 2011; 1359-1360.
- 8) **Molitoris BA:** „*Acute renal failure.*“ Drugs today (Barc.) 1999, 35(9): 659-666
- 9) **Herget-Rosenthal S, Langenbeck M:** „*Akutes Nierenversagen- Definition, Erkennung, Prävention.*“ Dialyse aktuell, 2010; 14: 138-148.
- 10) **Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N:** „*Delayed graft function in renal transplantation.*“ Jama 2006; 295(23): 2765-2779.
- 11) **Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Workgroup ADQI:** „*Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology need: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quakity Initiative (ADQI) Group.*“ Critical Care, 2004: R204-R212.
- 12) **Pannu M, Wiebe N, Tonelli M:** „*Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy.*“ Jama 2006; 295(23): 2765-2779.
- 13) **Steiner RW:** „*Interpreting the fractional excretion of sodium.*“ Am J Med, 1984; 77: 699-702.

- 14) **Pepin MN, Bouchard J, Legault L, Ethier J:** „*Diagnostic performance of fractional excretion of urea and fractional excretion of sodium in the evaluation of patients with acute kidney injury with or without diuretic treatment.*” *Am J Kidney Dis*, 2007; 50: 566-573.
- 15) **Riemann JF, Galle PR, Fischbach W:** „*Gastroenterologie in Klinik und Praxis: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis.*“ Band 1, Intestinum. Stuttgart; Georg Thieme Verlag, 2007; 964.
- 16) **Mendelssohn D, Cole E:** „*Outcomes of percutaneous kidney biopsy, including those of solitary native kidney.*” *Am J Kidney Dis* 1995; 26(4): 580-585.
- 17) **Coca SG, Yalavarthi R, Concato J, Parikh CR:** „*Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review.*” *Kidney International*, 2008; 73: 1008-1016.
- 18) **Star RA:** „*Treatment of acute renal failure.*” *Kidney International*, 1998; 54: 1817-1831.
- 19) **Needham E:** „*Management of acute renal failure.*” *Am Fam Physician*, 2005; 72(9): 1739-1746.
- 20) **Vinsonneau C, Camus S, Combes A:** „*Continuous venovenous haemodiafiltration versus intermittent haemodialysis for acute renal failure in patients with multiple organ dysfunction syndrome: a multicenter randomized trial.*” *Lancet*, 2006; 368:379-385.
- 21) **Goldberg R, Dennen P:** „*Long-term outcomes of acute kidney injury.*” *PubMed*, 2008; 15(3): 297-307.
- 22) **Coca SG, King Jr JT, Rosenthal RA, Perkal MF, Parikh CR:** „*The duration of postoperative acute kidney injury is an additional parameter predicting long-term survival in diabetic veterans.*” *Kidney International*, 2010; 78: 926–933.
- 23) **Schrier RW:** „*Need to intervene in established acute renal failure.*” *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2756-2758.
- 24) **Schiffl H, Lang SM, Fischer R:** „*Daily haemodialysis and the outcome of renal failure.*” *New Engl Journ Med* 2002; 346: 305-310.
- 25) **Groeneveld ABJ, Tran DD, van der Meulen J:** „*Acute renal failure in the medical intensive care unit: predisposing, complicating factors and outcome.*” *Nephron* 1991; 59: 602-610.

- 26) **Bjerke K, Halstensen TS, Jahnsen F, Pulford K, Brandtzaeg P:** „*Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (Calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes.*” Gut 1993; 34: 1357-1363.
- 27) **Pillay SN, Asplin JR, Coe FL:** „*Evidence that calgranulin is produced by kidney cells and is an inhibitor of calcium oxalate crystallization.*” Am J Physiol 1998; 275: F255-F261.
- 28) **Thurgood LA, Ryall RL:** „*Proteomic analysis of proteins selectively associated with hydroxyapatite, brushite, and uric acid crystals precipitated from human urine.*” J Proteome Res 9: 5402-5412.
- 29) **Yui S, Nakatani Y, Mikami M:** „*Calprotectin (S100A8/S100A9), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity.*” Biol. Pharm. Bull. 2003; 26(6) 753-760.
- 30) **Gisbert JP, McNicholl AG:** „*Questions and answers on the role of faecal Calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease.*” Dig Liver 2009; 41: 56-66.
- 31) **Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I:** „*Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease.*” Gastroenterology 2002; 123: 450-460.
- 32) **Poullis A, Foster R, Northfield TC, Mendall MA:** „*Review article: Faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease.*” Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 675-681.
- 33) **Lundberg JO, Hellstrom PM, fagerhol MK, Weitzberg E, Roseth AG:** „*Technology insight: Calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease.*” Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2: 96-102.
- 34) **Angriman I, Scarpa M, D'Inca R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, Sturniolo GC, D'Amico DF, Plebani M:** „*Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease.*” Clin Chim Acta 2007; 381: 63-68.
- 35) **Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK:** „*Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, Calprotectin.*” Lancet 1990; 336: 763-5.
- 36) **Lackmann M, Cornish CJ, Simpson, Moritz RL, Geczy CL:** „*Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins.*” J Biol Chem 1992; 267: 499-504.

- 37) **Ghavami S, Kerckhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F:**
„Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions.” J Leukoc Biol, 2004; 76: 69-75.
- 38) **Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J:** „The endogenous Toll-like-receptor 4 agonist S100A8/9 (Calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity and cancer.” Journal of Leukocyte Biology, 2009; 557-566.
- 39) **Giorgini A, Brown HJ, Sacks SH, Robson MG:** „Toll-like receptor 4 stimulation triggers crescentic glomerulonephritis by multiple mechanism including a direct effect on renal cells.” Am J Pathol 2010; 177: 644-653.
- 40) **Soylu A, Kizildag S, Kavukcu S, Cingoz S, Turkman M, Demir BK, Sakizli M:**
„TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly, and TLR-4 Thr399Ile polymorphisms in Henoch-Schonlein purpura with and without renal involvement.” Rheumatol Int, 2009; 30: 667-670.
- 41) **Gluba A, banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, Rysz J:** „The role of Toll-like receptors in renal diseases.” Nat Rev Nephrol, 2010; 6: 224-235.
- 42) **Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van't Veer C:** „In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation.” J immunol, 2002; 168: 1286-1293.
- 43) **Foell D, Wittkowski H, Roth J:** „Monitoring disease activity by stool analyses: From occult blood to molecular markers of inflammation and damage.” Gut, 2009; 58: 859-868.
- 44) **Kristinsson J, Røseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H, Børner OP, Raknerud N, Nygaard K:** „Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma.” Dis Colon Rectum, 1998; 41: 316-321
- 45) **Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltinti G:** „Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation.” Dig and Liver Dis, 2003; 35 (9): 642-647.
- 46) **Joshi S, Lewis SJ, Creanor S, Ayling RM:** „Age-related faecal calprotectin, lactoferrin and tumor M2-PK concentrations in healthy volunteers.” Annals of Clinical Biochem, 2010; 47: 259-263.

47) **Cole RT, Masoumi A, Triposkiadis F, Giamouzis G, Georgiopoulou V, Kalogeropoulos A, Butler J: „Renal dysfunction in heart failure.”** Med Clin North Am, 2012; 96(5):955-974.

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sandra Frischmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Calprotectin im Urin zur Differenzierung des prä- und intrarenalen akuten Nierenversagens“

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 den ausgewählten Publikationen 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 Autorin 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

7.2 Lebenslauf

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

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

7.3 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sandra Frischmann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Heller, Frank; Frischmann, Sandra; Grünbaum, Maria; Zidek, Walter; Westhoff, Timm, Urinary. Calprotectin and the Distinction between Prerenal and Intrinsic Acute Kidney Injury, Clinical Journal of the American Society of Nephrology, October 2011

Beitrag im Einzelnen

„Sandra Frischmann war für die Durchführung der klinischen Studie einschließlich Gewinnung der Proben, Erhebung der klinischen Daten, Mitwirkung bei der Bestimmung der Calprotectinkonzentration und Analyse der Daten verantwortlich.“

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Timm Westhoff für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die professionelle und zuverlässige Betreuung dieser Dissertation. Ich würde immer wieder gerne mit Dir zusammenarbeiten.

Dr. Sophie Ludwig möchte ich ganz herzlich für ihren Ansporn sowie für ihre unermüdliche Unterstützung danken. Du warst der nötige Antrieb.

Meinem Ehemann Karsten Brodowski, der nie gezweifelt hat: in liebevoller Dankbarkeit für Deine Geduld und Disziplin und einfach nur für das „mich ertragen“. Ob Sport, Studium oder Arbeit, Du bist mir ein großes Vorbild.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer daran geglaubt haben: Heidi Schäfer-Frischmann und Herbert Frischmann, für die Kraft, die Inspiration und Eure unendliche Liebe...und dafür, dass ihr seid, wie ihr seid. Ich könnte mir keine besseren Eltern wünschen.

Heidi, Herbert und Karsten: Euch sei diese Arbeit gewidmet!