

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pilotstudie zur Wertigkeit von alpha- und pi-GST bei  
Nierenspender und -empfänger (Leichen- und Lebendspende)  
als prädiktiver Marker der Transplantatfunktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Shadi Katou  
aus Al-Ain

Datum der Promotion: 14.09.2018

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einführung**

1.1	Nierentransplantation	7
1.2	Immunsuppression	8
1.3	Akute Dysfunktion nach Nierentransplantation (Definition, Ursachen, Häufigkeit)	12
1.4	Aktuelle Strategien zur akuten Überwachung der Transplantatfunktion	14
1.5.	Neue Ansätze zur Überwachung der Transplantatfunktion („Bio-Monitoring“)	16
1.6	Potentieller Biomarker zur Erfassung einer Nierendysfunktion	18
1.6.1	Glutathion-S-Transferase, Funktion, Isotypen	18
1.6.2	Andere Biomarker der Niere	19
1.7	Ableitung der wissenschaftlichen Fragestellung	21

### **2. Methodik**

2.1	Patienten (Studienprotokoll, Ein- Ausschlusskriterien, Ethikvotum)	22
2.2	Materialien	23
2.2.1	Probengewinnung und Verarbeitung	23
2.2.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.2.3	Software	24
2.3	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	24
2.4	Statistik	25

### **3. Ergebnisse**

3.1	Demographische Daten	26
3.2	Nierenfunktion (Kreatinin und GFR)	28
3.2.1	Leichenspender	29
3.2.2	Leichenspende-Empfänger	29
3.2.3	Lebendspender	31
3.2.4	Lebendspende-Empfänger	32
3.3	Immunsuppressivaspiegel	34
3.4	Verlauf GST	35
3.4.1	Gruppen	35
3.4.1.1	Leichenspender	35
3.4.1.2	Leichenspende-Empfänger	38

3.4.1.3 Lebendspender	39
3.4.1.4 Lebendspende-Empfänger	41
3.4.2 Subgruppen der Empfänger (Vergleich Lebend- versus Leichenspende)	42
3.4.2.1 Akute Abstoßungsreaktion (Subgruppe 1)	42
3.4.2.2 CNI-Toxizität (Subgruppe 2)	43
3.4.2.3 Akute Abstoßungsreaktion und CNI-Toxizität (Subgruppe 3)	45
3.4.2.4 Verzögerte Organfunktion/Delayed Graft Function(Subgruppe 4)	46
3.4.2.5 Ohne Ereignis (Kontrollen, Subgruppe 5)	47
3.4.3 Unterschiede innerhalb der Subgruppen Leichenspende-Empfänger	49
3.4.3.1 Akute Abstoßungsreaktion vs. Kontrollgruppe	49
3.4.3.2 CNI-Toxizität vs. Kontrollgruppe	52
3.4.3.3 Akute Abstoßungsreaktion und CNI-Toxizität vs. Kontrollgruppe	53
3.4.3.4 Delayed Graft Funktion vs. Kontrollgruppe	55
3.4.4 Unterschiede innerhalb der Subgruppen der Lebendspende-Empfänger	58
3.4.4.1 Akute Abstoßungsreaktion vs. Kontrollgruppe	58
3.4.4.2 CNI-Toxizität vs. Kontrollgruppe	60
3.4.4.3 Akute Abstoßungsreaktion und CNI-Toxizität vs. Kontrollgruppe	61
<b>4. Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>7. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>81</b>
<b>8. Curriculum Vitae</b>	<b>82</b>
<b>9. Publikationsliste</b>	<b>85</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AKI	Acute Kidney Injury
AK	Antikörper
ANV	akutes Nierenversagen
AR	Acute Rejection (=akute Abstoßung)
ATN	Akute Tubulusnekrose
AUC	Area Under Curve
BMI	Body Mass Index
CyA	Cyclosporin
CIT	Cold Ischemic Time (=kalte Ischämiezeit)
CNI	Calcineurin-Inhibitor
DGF	Delayed Graft Function
DM	Diabetes Mellitus
eGFR	errechnete glomeruläre Filtrationsrate
ESRD	End Stage Renal Disease (=terminale Niereninsuffizienz)
$\alpha$ -GST	alpha-Glutathion-S-Transferase
$\pi$ -GST	pi-Glutathion-S-Transferase
MMF	Mycophenolat-Mofetil
M.W.	Mittelwert (Mean)
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NGAL	Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalcin
n.s.	not significant (nicht signifikant)
NTx	Nierentransplantation
POD	postoperativer Tag
ROC	Receiver Operating Characteristic
S.D.	Standard Deviation
S.W.	Spannweite
SEM	Standard Error of Mean
Tac	Tacrolimus
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WIT	Warm Ischemic Time (= warme Ischämiezeit)

## **Abstrakt (Deutsch):**

**Einleitung:** Ziel dieser Studie war die Wertigkeit von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST im Urin als Biomarker zur Beobachtung und Beurteilung der Nierentransplantatfunktion vor und in der frühen Phase nach Transplantation in Lebend- und Leichenspende zu untersuchen.

**Methoden:** Es wurden prospektiv hirntote Leichenspender ( $n = 30$ ) und Lebendspender ( $n = 50$ ) sowie ihre entsprechende Empfänger eingeschlossen.  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte im Urin sowie die klinischen Routineparameter wurden an den Tagen 0, 1, 3, 5 und 7 bestimmt. Empfänger wurden je nach Ereignis in Subgruppen unterteilt: akuter Abstoßung (AGR), Calcineurin-Inhibitor-Toxizität (CNI), verzögerter Transplantatfunktion (DGF) und mit solchen ohne Ereignisse verglichen.

**Ergebnisse:**  $\pi$ -GST zeigte signifikante Unterschiede in Leichenspende-Empfängern mit AGR oder DGF am ersten Tag nach der Transplantation ( $p = 0,0023$  bzw.  $p = 0,036$ ). Hohe  $\pi$ -GST-Werte am POD1 (Cutoff  $> 21,4$  ng / mg uCrea bzw.  $> 18,3$  ng / mg uCrea bei AGR bzw. DGR) unterschieden zwischen Abstoßung und keine Abstoßung (Sensitivität, 100%; Spezifität, 66,6%) sowie zwischen DGF und normal funktionierende Nierentransplantate (Sensitivität, 100%; Spezifität, 62,6%). Im Urin der Lebendspende-Empfänger waren  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST ca. zehnmal niedriger als in Leichenspende-Empfängern. Interessanterweise waren  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in den Leichenspendern mit eingeschränkter Transplantatfunktion erhöht.  $\alpha$ -GST-Werte  $> 33,97$  ng / mg uCrea bei Leichenspende zeigten eine Prädiktion für AGR mit einer Sensitivität und Spezifität von 77,7% bzw. 100% an. Allerdings konnte allein anhand der  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte im Urin nicht zwischen den verschiedenen Ursachen der Nierentransplantatschädigung differenziert werden.

**Schlussfolgerung:** Die Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST im Urin kann bei Nierenleichenspende der Voraussage und Detektion von transplantatbeeinträchtigenden Ereignissen dienen. Um den möglichen Vorteil solcher Biomarker aufzuklären, sind weitere Analysen erforderlich.

## **Abstract (English):**

**Introduction:** The aim of this study was to analyze the value of  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST in urine to monitor and predict the course of kidney graft function in the early phase after kidney transplantation and to characterize its potential value to predict organ quality from corresponding donor urine analyses.

**Methods:** We prospectively analyzed urine samples from brain dead (n=30) and living related (n=50) kidney donors and their corresponding recipients over a course of seven days. Urinary  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST values were measured. Kidney recipients were subgrouped into patients with acute rejection (AGR), calcineurin inhibitor toxicity (CNI), delayed graft function (DGF) and compared to those without any events.

**Results:** Urinary  $\pi$ -GST revealed significant differences in deceased kidney donor recipients with recorded episodes of AGR or DGF at day one after transplantation ( $p=0,0023$  and  $p=0,036$ , respectively). High  $\pi$ -GST values at POD1 (cutoff  $>21.4$  ng/mg uCrea or  $>18.3$  ng/mg uCrea for AGR or DGR, respectively) distinguished between rejection and no rejection (sensitivity, 100%; specificity, 66.6%) as well as between DGF and normal-functioned grafts (sensitivity, 100%; specificity, 62.6%). In living donor recipients, urine levels of  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST were about ten times lower than in deceased donor recipients.

In recipients from deceased donors with impaired graft performance, urinary  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST were elevated.  $\alpha$ -GST values  $>33,97$  ng/mg uCrea were indicative of AGR with a sensitivity and specificity of 77,7% and 100%, respectively.

However, in the complex setting of transplantation, determination of  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST urine levels alone was incapable to distinguish between different causes of kidney graft damage.

**Conclusion:** In deceased donor kidney transplantation, evaluation of urinary  $\alpha$ - and  $\pi$ -GST seems to predict different events that deteriorate graft function. To elucidate the potential advantage of such biomarkers, further analysis are warranted.

## **1. Einführung**

### **1.1 Nierentransplantation**

Auch wenn die erste erfolgreiche Nierentransplantation bereits 1954 durch Murray in Boston als Lebendspende zwischen einem homozygoten Zwillingenpaar (1) erfolgte, und hier bereits die technischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transplantation vorlagen, waren die Ergebnisse aufgrund des Fehlens einer kompetenten Immunsuppression bei immunologisch divergenten Spender-/Empfänger Pärchen zunächst sehr schlecht. Erst mit der Entdeckung und klinischen Einführung von Cyclosporin Ende der achtziger Jahre durch die Firma Sandoz (2), konnte die Transplantation als bevorzugte Therapieoption der terminalen Niereninsuffizienz unterschiedlicher Genese etabliert werden. Heute liegt die Anzahl der durchgeführten Nierentransplantationen alleine in Deutschland im Jahr 2014 bei 2128, wovon 1508 Nieren von Leichenspendern und 620 Nieren von Lebendspendern stammten (3). Durch die breite Etablierung des Verfahrens ist es schnell zu einem Missverhältnis zwischen Organangeboten potentieller Leichenspenden und Nachfrage gekommen. So standen am Ende des Jahres 2014 insgesamt 7961 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation. Um eine gerechtere Verteilung zu gewährleisten, werden Organe in Deutschland über eine zentrale Institution (Eurotransplant) nach strengen Allokationsregeln verteilt und vermittelt, und die Wartezeit vom Zeitpunkt der ersten Dialyse bis zum Transplantationszeitpunkt kann mittlerweile, abhängig von Blutgruppe, Immunologie und Alter, bis zu 10 Jahren betragen (4).

Die Transplantation ist nicht nur das kostengünstigste und effektivste Verfahren der Nierenersatztherapie ist, sondern die Patienten profitieren auch erheblich hinsichtlich ihrer Lebensqualität und Überlebensprognose (5). Daher werden nicht nur Strategien gesucht, die das Organangebot verbessern, sondern Ziel vieler Forschungsgruppen ist vor allem auch das Überleben der Transplantate, das aktuell im Durchschnitt bei 8-10 Jahren liegt (6), weiter zu verbessern. Eine Optimierung des Organangebots beinhaltet auch die zunehmende Durchführung von Lebendspenden, eine Erweiterung des Altersspektrums der Spender z.B. durch die Einführung des „Old for Old“ Programmes sowie die Transplantation mit ABO-Inkompatibilität (7). Bei der Rate des akuten, aber auch chronischen Transplantatüberlebens konnten in den letzten drei Dekaden signifikante Verbesserungen beobachtet werden. Dies ist auf die Fortschritte der Human Leukocyte Antigen (HLA)-Typisierung und der „cross-match“-Techniken, die Einführung modernerer Immunsuppressiva und bessere Prävention und Behandlung

von frühe Komplikationen, zum Beispiel Infektionen, zurück zu führen. Die durchschnittliche Transplantatfunktionsrate liegt heutzutage nach einem Jahr bei über 90% und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 70 - 80% (6).

Eine verlängerte Dialysedauer stellt für die Patienten nicht nur eine psychische und physische Belastung dar, sondern es zeigt sich auch eine erhöhte Mortalitätsrate von Patienten auf der Warteliste. In diesem Zusammenhang konnten Wolfe et al. bereits 1999 zeigen, dass allein die Tatsache, dass Patienten für eine Transplantation gelistet wurden, zu einer Halbierung der Mortalität führte. Interessanter an dieser Studie war aber vor allem, dass weiter gezeigt werden konnte, dass die Nierentransplantation selber zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität im Vergleich zu den gelisteten, aber noch nicht transplantierten Patienten, führte. Dieser Effekt zeigte sich statistisch allerdings erst nach 244 Tagen, weil auch die Transplantation, bei den in der Regel multimorbiden Patienten, ein erhöhtes Sterberisiko nach sich zieht (8). Die Tatsache, dass eine Nierentransplantation im Vergleich zur Dialyse, das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses sowie die Hospitalisationsphasen senkt und darüber hinaus die Lebensqualität des Patienten steigert, konnte auch in weiteren Studien dargestellt werden (5). Insbesondere ist die Dialyse, unabhängig von der Art des Verfahrens, mit einem hohen Mortalitätsrisiko bei Patienten nach einem Transplantatversagen vergesellschaftet (9).

Die Indikation zur Nierentransplantation ist prinzipiell das terminale Nierenversagen, das eine Dialysebehandlung erforderlich macht. Mit generell zunehmender Lebenserwartung und einer damit verbundenen erhöhten Morbidität durch z.B. Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, stellen diese Grunderkrankungen die häufigsten Ursachen für ein chronisches Nierenversagen und dem Beginn einer Nierenersatztherapie dar. Im Jahr 2014 war eine zystische Nierenkrankheit, aber auch der Diabetes mellitus mit Nierenkomplikationen oder das chronische nephritische Syndrom die häufigsten Indikationen für eine Nierentransplantation (3).

## **1.2 Immunsuppression**

Da ein homozygoten Zwillingspaar genetisch absolut identisch ist, führt ein Transplantat von einer solchen Spender-/Empfängerkonstellation nicht zu einer Abstoßung. Eine solche Konstellation hat sich das Team um Joseph Murray am Peter Brent Brigham Hospital in Boston 1954 zu nutze gemacht, um die erste erfolgreiche

Nierentransplantation zwischen einem eineiigen Brüder-Zwillingspaar durchzuführen (1). Da aber ein genetisch identischer Zwilling nur selten als Lebend- und schon gar nicht als Leichenspender zur Verfügung steht, war es erforderlich, um die Transplantationsmedizin weiter zu entwickeln, auch Nieren zwischen immunologisch differenten Individuen zu transplantieren, was jedoch zunächst, ohne die Möglichkeit einer spezifischen medikamentösen Unterdrückung des Immunsystems, regelhaft zu einer Abstoßungsreaktion führte. Erst mit der Einführung des Wirkstoffs Azathioprin in den frühen 1960er Jahren konnte deshalb erstmals ein akzeptables Langzeitüberleben eines Transplantats verwirklicht und die Abstoßungskrisen nach Transplantation reduziert werden (10). Allerdings war es erst die Einführung von Cyclosporin Anfang der 1980er Jahre durch die Fa. Sandoz (heute Novartis) und die ersten erfolgreichen klinischen Studien durch Sir Roy Calne in England (11), die zu einer wirklich signifikanten Reduzierung akuter Abstoßungen geführt haben, wodurch die Transplantation aller soliden Organe letztendlich zu einer weit verbreiteten und etablierten Therapieoption geworden ist.

Das Einjahres-Überleben eines Transplantates liegt heute, dank moderner Immunsuppressionsprotokolle, bei Leichenspendernieren bei ca. 90% und bei Lebenspendernieren bei ca. 95%, und die akute Abstoßungshäufigkeit nimmt weiter in zunehmendem Maße ab (12). Trotzdem kommt es noch bei ca. 10-25% aller Nierentransplantationen zu einer akuten Abstoßung, die dann am häufigsten in den ersten 3 Monaten nach Transplantation auftritt. Sie stellt nach wie vor nicht nur eine Hauptkomplikation in der frühen postoperativen Phase, sondern auch einen wichtigen prognostischen Faktor für die langfristige Transplantatfunktion dar (13).

Um eine Abstoßung des Transplantates zu verhindern, werden dem Empfänger Medikamente gegeben, die dessen Immunsystem unterdrücken und z.B. auf verschiedenen Ebenen die T-Zell-Aktivierung hemmen. Eine dauerhafte Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Transplantat, d.h. ein Verzicht auf eine medikamentöse Immunsuppression, konnte bisher nur in Einzelfällen erreicht werden, jedoch werden meistens im Langzeitverlauf durch endogene Anpassungsvorgänge niedrigere Dosierungen von Immunsuppressiva benötigt. Derzeit wird an den meisten Zentren eine Dreifach-Kombination, bestehend aus Glukokortikoiden und einem Calcineurin-Inhibitor (Cyclosporin A oder Tacrolimus) plus einem antiproliferativen Medikament (z.B. MMF oder Sirolimus) plus eine initiale Induktionstherapie mit einem T-Zell Antikörper (z.B. Basiliximab) eingesetzt (14,15).

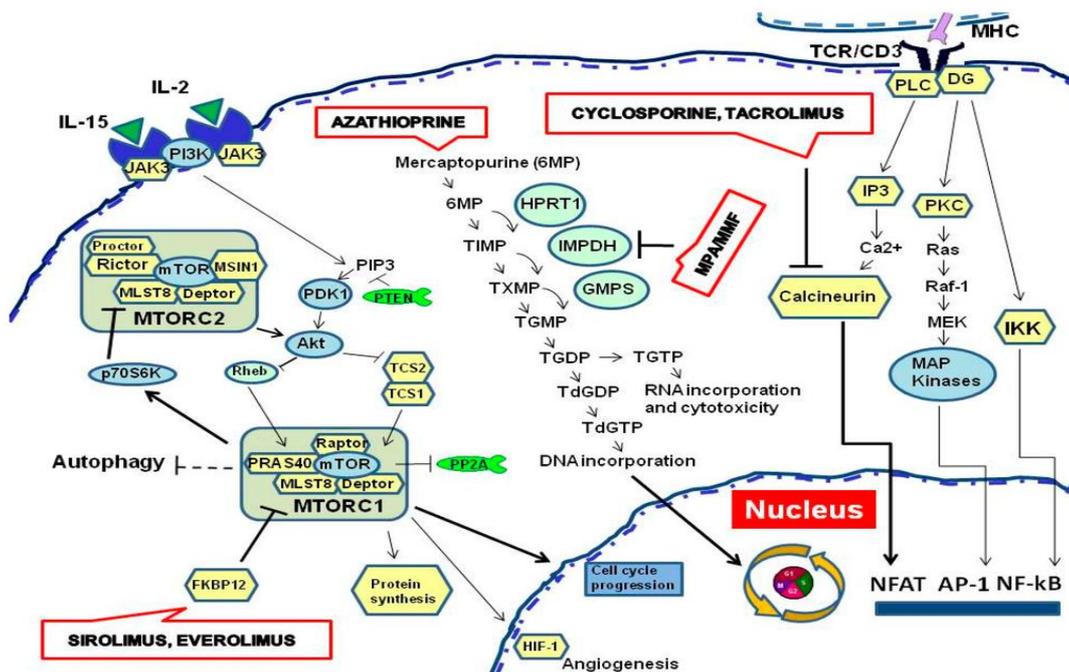


Abbildung 1. Schematische Übersicht der Wirkmechanismen verschiedener Immunsuppressiva (15)

Der Vorteil bzw. Sinn dieses Kombinationsprinzips ist eine optimierte Unterdrückung des Immunsystems, was durch die Gabe mehrerer Substanzen, die sich in ihren Wirkungsmechanismen unterscheiden und somit mehrere Signalwege der Immunantwort inhibieren, maximiert wird. Gleichzeitig ermöglicht die Kombinationsbehandlung eine Verminderung der Dosis der einzelnen Immunsuppressiva und damit eine Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen. Des Weiteren wird mit diesem Konzept angestrebt, nach der Überbrückung der frühen Abstoßungsphase auf eine der Immunsuppressionskomponenten vollständig zu verzichten, ohne die Transplantatfunktion zu beeinträchtigen (16)

Obwohl die neueren moderne Immunsuppressiva das Immunsystem selektiver und gezielter beeinflussen, ist ihre Wirkung auf andere nicht-immunologische Zellen im Körper nicht zu verhindern. Dadurch entstehen weiter dosis- und zeitabhängige Nebenwirkungen, die neben den kardiovaskulären Risikofaktoren (Hypertonie, Hyperlipidämie) die befürchtete Nephrotoxizität und das chronische Transplantatversagen umfassen. Weiter wird die artifizielle Immunschwäche von einem erhöhten Risiko für Infektionen und malignen Neoplasien (meist Lymphome) begleitet (17). Daher müssen sowohl die Blutspiegel (der Calcineurin-inhibitoren) als auch die

Nebenwirkungen der Immunsuppressionstherapie nach der Transplantation durch Anbindung an ein Transplantationszentrum intensiv überwacht werden (18, 19).

In der Nierentransplantationsmedizin richtet sich das Vorgehen bei einer akuten Abstoßung nach der Schwere einer Abstoßung, die wiederum histologisch nach einem international vereinheitlichten Schema (Banff-Klassifikation) eingestuft wird (20). Der therapeutische Ansatz basiert zumeist auf den histologischen Befunden einer Transplantatbiopsie. Symptomatisch präsentiert sich die akute Abstoßung durch eine akute Transplantatsdysfunktion mit einem Kreatinin-Anstieg im Serum sowie einem Rückgang der Urinausscheidung. Dabei bleibt der Patient jedoch ansonsten meistens asymptomatisch. Erschwerend ist dabei, dass auch andere, nicht-immunologische Faktoren, wie z.B. eine kompromittierte Durchblutung des Transplantats, ein Infekt oder die bereits erwähnte Nephrotoxizität der Calcineurin-Inhibitoren ein ähnliches klinisches Bild erzeugen können, weshalb in den meisten Fällen zur definitiven Ursachenabklärung nur die Biopsie bleibt. Diese hat jedoch auch Risiken wie z.B. eine Blutung, die je nach Schwere bis zu einem Transplantatverlust führen kann.

Bei hochgradigen Verdacht auf eine akute Abstoßung, und nach Ausschluss anderer Faktoren (z.B. durch Sonographie, Calcineurin-Inhibitor-Spiegel), kann auch schon vor dem Eingang des Biopsie-Ergebnisses mit einer hochdosierten intravenösen Antirejektions-Therapie (z.B. mit hochdosiertem Methylprednisolon) begonnen werden. Falls die Biopsie eine höhergradige Abstoßung nachweist oder sich keine Ansprache auf die hochdosierte Steroidtherapie zeigt, kommen als zweite Stufe Antikörper zum Einsatz. Ein wichtiger Vertreter aus dieser Gruppe ist z.B. das gegen die T-Lymphozyten gerichtete Thymoglobulin. Bei stärker immunisierten Patienten mit erhöhter Inzidenz akuter Rejektionen ist auch eine Anpassung des Langzeit-Immunsuppressionsprotokolls zum Beispiel durch eine Erhöhung der Calcineurin-Inhibitor-Spiegel oder die Hinzunahme weiterer, über einen anderen Mechanismus wirkende Substanzen, wie Mycophenolatmofetil (Cellcept) oder Sirolimus (Rapamycin), einem sog. mTOR Inhibitor erwägenswert (21). In manchen Zentren wurde in den letzten Jahren auch eine initiale Induktionstherapie als Standard eingeführt. Die Ergebnisse dazu sind besonders bei Nierentransplantationen vielversprechend und mit einer deutlich höheren Überlebensrate sowohl des Transplantats als auch der Patienten zu verzeichnen (22, 23).

### **1.3 Akute Dysfunktion nach Nierentransplantation (Definition, Ursachen, Häufigkeit)**

Das akute Nierenversagen - oder auch akute Niereninsuffizienz- ist definiert als ein abrupter oder rapider, jedoch reversibler Rückgang der renalen Ausscheidungsfunktion und/oder der Verlust der Fähigkeit der Nieren zur Elimination harnpflichtiger Substanzen. Dieser Zustand kann innerhalb von Stunden bis Tagen einsetzen und ist durch einen Anstieg der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Serum oder Azotämie (Erhöhung der Konzentration von stickstoffhaltige Substanzen im Blut ) und/oder die gleichzeitige Abnahme der Urinausscheidung gekennzeichnet (24). Zudem kommt es zu einer Dysregulation des extrazellulären Volumens und dem Säure-Basen- und Elektrolythaushalt. Das akute Nierenversagen ist immer noch, trotz besserer Diagnostik- und Behandlungsoptionen, mit einer hohe Morbidität und Mortalität assoziiert (25, 26) .

In Jahr 2004 wurde auf einer „Consensus Konferenz“ von der Arbeitsgruppe „Acute Dialysis Quality Initiative“ eine Definition und Klassifikation für das akute Nierenversagen festgelegt und unter dem Akronym RIFLE (**R**isk of Renal Dysfunktion, **I**njury to the Kidney, **F**ailure or **L**oss of Kidney Funktion, and **E**nd-stage Kidney Disease) veröffentlicht (27). Die RIFLE Kriterien basieren somit auf dem Ausmaß einer seriellen Kreatinin-Erhöhung bzw. des Abfalls der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und/oder Urinausscheidung, wobei zur Einstufung immer die aktuell am stärksten pathologisch veränderten Werte genutzt werden.

Um das gesamte Spektrum des Krankheitsbild besser beschreiben zu können, wurde 2007 der Begriff “akutes Nierenversagen” durch den Begriff “akute Nierenschädigung” verdrängt und von dem Acute Kidney Injury Network (AKIN) spezifische Kriterien für die Diagnosestellung einer akuten Nierenschädigung entwickelt (28). Das AKIN definiert eine akute Nierenschädigung als abrupte (innerhalb von 48 Stunden) Verschlechterung der Nierenfunktion, manifestiert durch eins der folgenden Merkmale:

- ein absoluter Anstieg des Serum-Kreatinins um 0.3mg/dL oder mehr
- ein prozentueller Anstieg des Serum-Kreatinins um 50% oder mehr
- eine Verminderung der Urinausscheidung auf weniger als 0.5 mL/kg/h über eine Dauer von 6 Stunden

Im Vergleich zu den RIFLE-Kriterien, die einen Zeitrahmen von einer Woche festlegen, um die Diagnose AKI festzustellen, reicht laut den AKIN-Kriterien als Differenz zwischen zwei Kreatinin-Werten ein Zeitraum von 48 Stunden. Außerdem wird hier auf Dehydratation und Obstruktion geachtet, denn die Kriterien dürfen nur bei einem optimierten Volumenstatus angewendet werden.

Das AKIN erarbeitete ein Einteilungssystem, das auf den RIFLE-Kriterien beruht und diese modifiziert. In diesem „Staging“-System wurden die Stadien „Risiko“, „Injury“ und „Failure“ jeweils durch die Stadien 1, 2 und 3 ersetzt. Patienten, die eine Nierenersatztherapie erhalten, werden automatisch und unabhängig von Serum-Kreatinin und Urinausscheidung als Stadium 3 eingestuft. Die Kategorien „Loss“ und „Endstage Renal Disease“ wurden als Folgen definiert und aus dem „Staging“-System eliminiert (29).

	GFR criteria	Urine output criteria
RIFLE (an acute rise in SCr over 7d)		
Risk	Increase in SCr $\geq 1.5 \times$ baseline or decrease in GFR $\geq 25\%$	UO $< 0.5$ mL/kg per hour $\times 6$ h
Injury	Increase in SCr $\geq 2.0 \times$ baseline or decrease in GFR $\geq 50\%$	UO $< 0.5$ mL/kg per hour $\times 12$ h
Failure	Increase in SCr $\geq 3.0 \times$ baseline or SCr $\geq 4.0$ mg/dL (354 $\mu$ mol/L) or decrease in GFR $\geq 75\%$	UO $< 0.3$ mL/kg per hour $\times 24$ h or anuria $\times 12$ h
Loss	Complete loss of kidney function $> 4$ wk	
ESKD	End stage renal disease ( $> 3$ mo)	
AKIN (an acute rise in SCr within 48 h)		
Stage 1	Same as RIFLE-Risk plus increase in SCr $\geq 0.3$ mg/dL ( $\geq 26.4$ $\mu$ mol/L)	Same as RIFLE
Stage 2	Same as RIFLE-Injury	
Stage 3	Same as RIFLE-Failure plus initiation of RRT	

Tabelle 1: RIFLE vs. AKIN Kriterien zur Definition der AKI (29).

In den ersten Wochen nach einer Nierentransplantation ist das Auftreten eines akuten Nierenversagens ein bekanntes und häufiges Problem, das das Transplantatüberleben signifikant beeinflussen kann. Eine häufige Ursache für ein akutes Nierenversagen in der frühen Phase nach Transplantation ist eine akute Tubulusnekrose, die mit mehreren Faktoren assoziiert ist. So wird sie zum Beispiel häufig bei einer Hypotension oder hohem Alter des Spenders, bei langen warmen (und kalten) Ischämiezeiten und bei

erhöhten vaskulären Resistenzindex-Werten beobachtet. Die akute Tubulusnekrose ist die Hauptursache für eine verzögerte Transplantatfunktion (sog. „delayed graft function“ DGF), die meistens durch die Notwendigkeit einer Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Transplantation charakterisiert wird (30). Nicht-immunologische Faktoren wie die warme Ischämiezeit, die Dialysepflichtigkeit vor der Transplantation und das Spenderalter spielen in dem Vorkommen der DGF ebenfalls eine Rolle (31, 32). Der Einfluss einer DGF auf die Langzeitfunktion des Transplantats ist umstritten. Sie scheint alleine, wenn entsprechend behandelt, laut mehrerer Studien, keinen nachteiligen Einfluss auf die Langzeitprognose des Transplantats zu haben, jedoch kann eine DGF das Risiko einer akuten Abstoßung erhöhen, was wiederum das Langzeitüberleben beeinträchtigt (33, 34).

Weiterhin stellt die akute Abstoßung nach wie vor eine Hauptursache für ein Transplantatversagen dar. Sie kann innerhalb von Tagen bis Wochen („early acute rejection“), aber auch Monate nach einer Transplantation („late acute rejection“), auftreten und ist sowohl mit dem akuten als auch chronischen Transplantatversagen assoziiert und hier der führende Faktor für die chronische Transplantatabstoßung (35, 36).

Weitere Ursachen des postoperativen akuten Nierenversagens können chirurgische Komplikationen (Thrombose der Nierenarterie, Arterienknick, Obstruktion des Harnweges) sowie nephrotoxische Immunsuppressiva (Calcineurin-Inhibitoren) sein.

#### **1.4 Aktuelle Strategien zur akuten Überwachung der Nierenfunktion**

In der Initialphase nach einer Nierentransplantation ist eine engmaschige Überwachung und Kontrolle der Transplantatfunktion notwendig, denn in der frühen postoperativen Phase treten die meisten chirurgischen Komplikationen auf und in den ersten Monaten nach der Transplantation ist das Risiko einer immunologischen Reaktion (akute Abstoßungsreaktion) am größten. Da solche Ereignisse nicht nur ein akutes Transplantatversagen verursachen können, sondern auch zu den multifaktoriellen Einflussgrößen eines Langzeit-Transplantatversagens gehören, werden in der Transplantationsmedizin dringend neue diagnostische Verfahren und Parameter benötigt, die auch kleinere Nierenschädigungen besser anzeigen oder sogar früher vorhersagen können.

Aktuell gehören zum Standardprogramm eines Monitoring nach Nierentransplantation eine Duplexsonographie der Transplantatgefäße und ableitenden Harnwege, eine

Überwachung der Urinausscheidung und eine regelmäßige Blutuntersuchung mit Bestimmung von Entzündungs- und Retentionsparametern sowie den Spiegel der immunsuppressiven Medikamenten.

Klassischerweise wird die Serum-Kreatinin-Konzentration zur Kontrolle der Nierenfunktion und der Diagnosestellung eines akuten Nierenversagens (AKI) benutzt. Allerdings kann die Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Blut in der Frühphase oder unmittelbar nach einer Nierenschädigung noch niedrig oder im höheren Normbereich sein, denn diese steigt erst an, wenn es zu einer Verminderung der GFR um mindestens 50% bei vorher normaler Nierenfunktion kommt (37). Kleinere Schäden der Niere können somit schlecht detektiert werden und ein möglicher Therapie-Beginn verzögert sich. Ein Anstieg des Kreatinins bedeutet also im Grunde ein bereits spätes Zeichen der Nierenschädigung oder weist lediglich auf eine schon bestehende Schädigung hin und ist daher zur Prädiktion nicht geeignet.

Des Weiteren sind laut den AKIN-Kriterien zwei Kreatinin-Werte in einem Zeitraum von 48 Stunden erforderlich um die Diagnose festzulegen. Dies ist in der Situation einer Nierentransplantation eine relativ lange Zeit, in der das Transplantat weiter geschädigt werden kann (38).

Außerdem sind die Retentionsparameter dialysierbar und demzufolge zur Einschätzung der Nierenfunktion unter einer Dialysebehandlung wenig geeignet. Erschwerend kommt hinzu, dass ein Anstieg der Kreatininkonzentration im Rahmen einer Sepsis, nach Applikation von Kontrastmitteln oder auch als Nebenwirkung einer medikamentösen Therapie, bei der die tubuläre Sekretion gehemmt wird, auftreten kann und der Ausgangswert individuell unter anderem von Muskelmasse und Ernährung abhängig ist (39). Auch die Harnstoffkonzentration kann ohne das Vorliegen einer Nierenschädigung z.B. bei einer gastrointestinalen Blutung, Steroideinnahme oder Mangelernährung erhöht sein (40).

In der Regel ist eine eindeutige und sichere Differenzierung zwischen den Ursachen eines akuten Nierenversagens nur über eine Biopsie des Transplantats möglich. Die Schwere einer Abstoßungsreaktion wird im histologischen Bild nach der BANFF Klassifikation eingestuft und dementsprechend die passende Therapie eingeleitet (41). Mit der wesentlichen Verbesserung der Sicherheit dieser diagnostischen Methode, konnten zwar die damit assoziierten Risiken und Komplikationen deutlich reduziert, jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zu den häufigsten Komplikationen einer Biopsie gehören eine Hämaturie, Blutung, perirenale Hämatome, arteriovenöse

Fisteln und als schlimmstes Ereignis ein Transplantatverlust (42). Trotz ihrer Invasivität, wird dieser Methode infolge mangelnder Alternativen immer noch durchgeführt, um so eine klare Diagnose zu bekommen, aus der sich eine zeitnahe adäquate Therapie ableitet, um so eine weitere Schädigung des Transplantats zu vermeiden.

### **1.5. Neue Ansätze zur Überwachung der Transplantatfunktion („Bio-Monitoring“) und potentielle Biomarker**

Die Suche nach schnellen, nicht-invasiven und vor allem spezifischeren Methoden und Parametern zur Beurteilung einer Transplantatfunktion und zur möglichen Differenzierung eines Pathomechanismus, wurde in den letzten Dekaden umfangreich intensiviert. Ideal wären Parameter, die eine direkte Aussage zu dem Ausmaß und der Art einer Nierenschädigung zulassen (um z.B. zwischen einer akuten Abstoßung und anderen Ursachen wie einer medikamenten-assoziierten Toxizität unterscheiden zu können), weil es damit gelänge eine frühere Diagnose zu stellen und damit auch früher ursachenspezifisch reagieren zu können.

Ein solches Bio-Monitoring ist eine zur Zeit nicht nur in der Transplantatmedizin beforschte Methode, bei der es darum geht, neue, und für bestimmte Krankheitsbilder oder pathophysiologische Vorgänge typische Substanzen zu identifizieren. Bei der Niere fokussiert man sich dabei vor allem auf Körperflüssigkeiten, die unmittelbar im Kontakt mit dem Organ stehen, nämlich Blut und Urin. Die Vorstellung hierbei ist, dass bestimmte Substanzen, sog. Biomarker, die durch eine Schädigung der Nierenzellen entstehen, in das Blut oder den Urin freigesetzt werden. Attraktiv an diesem Ansatz ist vor allem auch die einfache Möglichkeit der Materialgewinnung, da man bisher als Goldstandard zur Beurteilung einer Nierentransplantatabstoßung immer noch auf die Biopsie angewiesen ist, die wie bereits beschrieben nicht nur technisch aufwendig ist, sondern auch das Transplantat gefährden kann (43).

Unter einem Biomarker versteht man in der Medizin ein charakteristisches biologisches Merkmal, das objektiv gemessen und ausgewertet und als Indikator für einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder zum Monitoring der pharmakologischen Antwort auf eine therapeutische Intervention herangezogen werden kann. Meistens handelt es sich um ein messbares Protein (Enzym, Hormon), es kann aber auch ein Gen, ein Genprodukt oder ein Molekül (MicroRNA) sein. Ein idealer Biomarker sollte möglichst kostengünstig und einfach zu messen sein und eine Stabilität in unterschiedlichen Gruppen (Geschlecht, Ethnizität) zeigen. Dennoch sollte

er eine hohe Sensitivität und Spezifität aufbieten. Ein Biomarker mit hoher Sensitivität zeigt eine Relevanz bzw. ist positiv bei nahezu allen Patienten, bei den die Krankheit tatsächlich vorliegt, wobei die hohe Spezifität beschreibt, dass der Biomarker bei den meisten Gesunden negativ getestet wird (44).

Für den Einsatz von Biomarkern in der klinischen Diagnostik hat sich in den letzten Jahren ein zunehmender Bedarf gezeigt, und Biomarker haben einen herausragenden Stellenwert in vielen Bereichen der Medizin erreicht. So wird auch in der Kardiologie, nachdem die Aspartat Aminotransferase zur Erkennung einer myokardialen Schädigung durch TroponinT, ein Marker mit höherer Spezifität und Sensitivität zum Myokardinfarkt, ersetzt wurde, nach weiteren Biomarkern gesucht (45).

Der am weitesten verbreitete und älteste Biomarker ist immer noch das zur Diagnose einer Nierenschädigung heran gezogene Serum-Kreatinin. Die Einschätzung der Nierenfunktion im klinischen Alltag fokussiert sich auf eine serielle Kreatinin-Konzentration und die Berechnung der GFR. Allerdings ist das Kreatinin, wie bereits ausgeführt, ein relativ ungenauer und eigentlich ungeeigneter Marker zur frühen Detektion einer Nierenschädigung und erlaubt auch keine Unterscheidung zwischen den möglichen Ursachen. Die Kreatinin-Konzentration zeigt erst einen Anstieg im Serum nach einem Verlust von ca. 50% der Nierenfunktion und kann außerdem von mehreren nicht-renalen Faktoren, wie zum Beispiel dem Alter, Geschlecht, der Muskelmasse, einer Medikamenteneinnahme und dem Volumenstatus beeinflusst werden.

Aufgrund dieses Mangels, fokussieren sich viele Studien auf neue Marker zum „Monitoring“ einer Nierentransplantatfunktion und dem Auftreten eines akuten Nierenversagens (AKI) nach einer Transplantation. Es besteht ein dringlicher Bedarf für eine sensitivere und weniger invasive Diagnostik, die früher auf eine Nierenschädigung sowie deren Mechanismus hinweist, um möglichst auf eine Biopsie des Transplantats verzichten zu können.

Die Eigenschaften eines idealen Biomarkers zur Früherkennung einer Nierenschädigung sind folgende:

- Er wird aus den geschädigten Zellen freigesetzt und weist spezifisch auf die Niere hin
- Seine Konzentration im Körper sollte proportional zu dem Ausmaß der Schädigung sein
- Er wird in der Frühphase des Ereignisses ausgelöst, wenn die Organschädigung noch reversibel ist

- Er kann dem therapeutischen Monitoring dienen, indem seine Konzentration nach der akuten Schädigungsepisode oder unter einer erfolgreichen Therapie rasch abfällt
- Er ist schnell und zuverlässig messbar

## **1.6 Potentieller Biomarker zur Erfassung einer Nierendysfunktion**

### **1.6.1 Glutathion-S-Transferase, Funktion, Isotypen**

Die Glutathion-S-Transferasen sind multifunktionelle Enzyme, die in zahlreichen Geweben vorkommen und hauptsächlich der Entgiftung von xenobiotischen Substanzen dienen und bei der Metabolisierung endogener Substanzen wie Leukotrienen und Prostaglandinen beteiligt sind. Je nach Lokalisation in der Zelle wird die Familie der Glutathion-S-Transferasen in drei Superfamilien unterteilt: zytosolisch, mitochondrial und microsomal (46). Des Weiteren werden diese nach ihrer Struktur und ihren physiochemischen Eigenschaften in weitere Isoformen klassifiziert.

Alpha- und pi-GST befinden sich im Zytosol und kommen vor allem in der Leber und Niere vor. Während alpha-GST ein 51kDa großes Protein ist und hauptsächlich in den Hepatozyten und in dem proximalen Abschnitt des Nierentubulus exprimiert wird, besitzt pi-GST eine Molekülmasse von 47kDa und wird in höherer Konzentration in den Gallengangszellen sowie im distalen Tubulus in der Nieren gefunden (47, 48).

Im Urin eines Gesunden ist GST kaum nachweisbar. Kommt es jedoch zu einer Schädigung der renal tubulären Epithelzellen oder einem Zelluntergang wird GST in das tubuläre Lumen freigesetzt und in hoher Konzentration im Urin nachgewiesen (49, 50). In der warmen Ischämiezeit und durch nephrotoxischen Wirkstoffe wie z.B. Immunsuppressiva betrifft die Schädigung hauptsächlich die proximalen Tubuli der Niere, wohingegen bei einer akuten Rejektion hauptsächlich die Zellen der distalen Tubuli geschädigt werden (51). Die Tatsache, dass alpha-GST ausschließlich in den proximalen Epithelzellen des Tubulus und pi-GST in dem distalen Epithelium ist, kann theoretisch eine präzisere Aussage zur Lokalisation einer Nierenzellschädigung und dadurch auch eine bessere Differenzierung zwischen den zugrunde liegenden Ursachen ermöglichen (52).

Sowohl in Menschen als auch Ratten zeigt die Bestimmung von alpha-GST im Urin in mehreren Studien eine hohe Sensitivität und Spezifität für eine proximale tubuläre Nekrose und der damit assoziierten DGF, aber auch einer medikamenten-induzierten Nephrotoxizität (53, 54). Bereits 1988 konnten Bäckman et al eine signifikante Relevanz von alpha-GST, früher auch als basisches GST beschrieben, zur Detektion von

Tubulusschäden in 69 transplantierten Patienten darstellen (55). In weiteren Studien wurde auch der Stellenwert von pi-GST im Urin nach einer Nierentransplantation untersucht. Es zeigten sich bei einer akuten Rejektion hohe Exkretionen von pi-GST aus dem distalen Tubulus (56). Darüber hinaus zeigte sich in einer Arbeit von Sarvary et al, in der alpha- und pi-GST im Urin von 61 Spendern bereits präoperativ ausgewertet wurde, für pi-GST eine Reliabilität von 68% als wertiger prädiktiver Marker für die Funktionsfähigkeit eines Transplantats und dessen Überlebensrate (57).

Die Konzentrationsmessung dieser beiden Isoformen von GST im Urin zur Monitoring eines Nierentransplantats könnte demzufolge eine hohe Wertigkeit haben. Als Biomarker in der Nierentransplantation könnte dies nicht nur eine genauere Angabe über den zugrunde liegenden Nierenschädigungsmechanismus vermitteln, sondern auch eine prädiktivere Aussage zur Transplantatüberlebensrate erlauben.

### **1.6.2 Andere Biomarker der Niere**

Eine frühe Schädigung im Bereich des proximalen Tubulus kann durch verschiedene weitere Proteine angezeigt werden. Basierend auf einer genomischen Analyse konnten bereits verschiedene Biomarker für einen Nierenschaden und tubuläre Reparaturmechanismen identifiziert werden. Die Anerkennung von insgesamt sieben Nieren-Dysfunktionsmarkern zur Anwendung in präklinischen Rattentoxizitätsstudien durch die US-Amerikanische FDA und die Europäische Arzneimittel Agentur (EMA) waren hierbei ein Meilenstein bei der Etablierung von Biomarkern (58). Wichtigste Vertreter sind das Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1),  $\beta$ 2-microglobulin und Cystatin C (59-61).

Andere bekannte Marker sind Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalcin (NGAL), Clusterin (Urin), Trefoil Factor 3, Interleukin 18, Calbindin, Epidermal growth factor, Osteopontin, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) und Vascular endothelial growth factor (VEGF) (62-65).

Diese Marker ermöglichen nicht nur ein sensibles Monitoring der Nierenfunktion, sondern geben auch Hinweise auf den Ort einer Schädigung (tubulär, glomerulär) oder den möglichen Schädigungsmechanismus innerhalb des Nierenparenchyms (siehe Abbildung 2) (66).

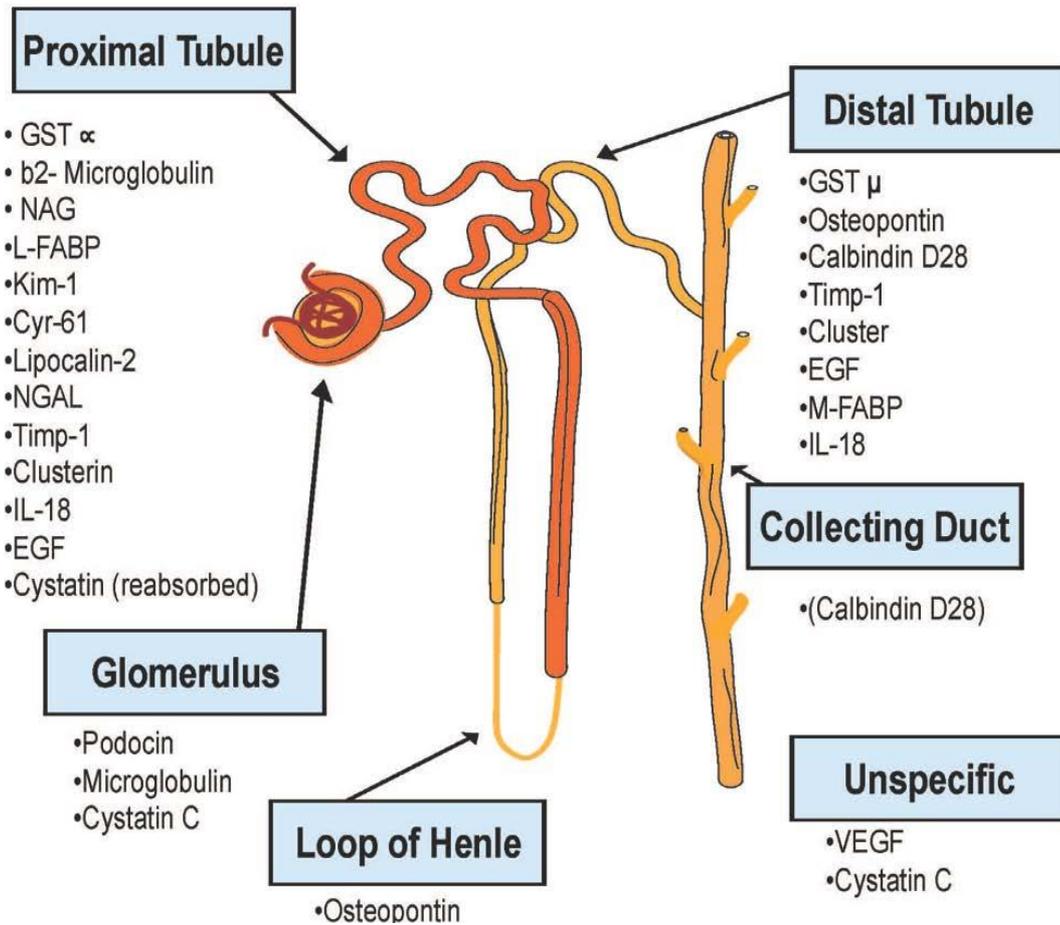


Abbildung 2. Marker der Nierenschädigung und ihre Zuordnung im Nephron (66)

## **1.7 Ableitung der wissenschaftlichen Fragestellung**

Zur Einschätzung einer Funktionsstörung oder einer Schädigung des Transplantats sind die heutigen Methoden meistens ungenau oder sehr invasiv. Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen bieten keine signifikante Sensitivität in der frühen Phase einer Nierenzellschädigung. Daher werden neue Parameter benötigt, deren Bestimmung zugänglich, kostengünstig und aussagekräftig ist.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die diagnostische Wertigkeit von zwei Isotypen des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) (alpha und pi) im Urin zur perioperativen Beurteilung der Nierenfunktion transplantierte Patienten und ihrer Spender zu analysieren und dabei folgende Fragen zu klären:

1. Hat GST im Urin der Spender einen prädiktiven Wert hinsichtlich der Organqualität von Nierentransplantaten?
2. Ist GST im Urin ein zuverlässiger Marker für die Überwachung der Nierentransplantatfunktion?
3. Ist GST im Urin ein signifikanter Marker für eine akute Abstoßungsreaktion?
4. Hat GST im Urin eine Bedeutung zur Prognoseabschätzung?

## **2. Methodik**

### **2.1 Patienten (Studienprotokoll, Ein- Ausschlusskriterien, Ethikvotum)**

Die vorliegende prospektive Studie ist von der Ethikkommission der Charité (Antragsnummer EA2/137/10) am 02.02.2011 genehmigt worden. Alle Probanden haben nach vorheriger ausführlicher Aufklärung und Information über den Ablauf und die Kriterien der Studie ihr freiwilliges schriftliches Einverständnis gegeben. Den Patienten wurde erklärt, dass die in der Studie untersuchten Materialien bei Routineentnahmen gewonnen und anonymisiert verarbeitet werden und dass die Probenuntersuchung kein weiteres Risiko für sie darstellt.

Es wurden Patienten mit einer *de novo* Nierentransplantation eingeschlossen, die nach ausführlicher Evaluation in das Lebendspenderprogramm unseres Zentrums oder in die Eurotransplant Listung einbezogen worden waren. Ausschlusskriterien waren ein Alter unter 18 Jahren sowie Simultan-Transplantationen (z.B. Niere plus Leber, Herz oder Pankreas).

Für die Studie wurde eine Gesamtanzahl von 100 Patienten vorgesehen, jedoch konnten aufgrund der seit 2010 zurückgegangenen Zahlen an Organspendern und damit auch Transplantationen in Deutschland im Studienzeitraum von zwei Jahren nur 80 Patienten eingeschlossen werden. Die Anzahl der Lebendspende-Transplantationen betrug 50, die der Leichenspende lag bei 30. Alle Transplantationen wurden zwischen 2010 und 2012 durchgeführt.

Die Patientengruppen wurden wie folgt gebildet:

- Hirntote Nierenspender (Gruppe A, n=30)
- Transplantat-Empfänger vom Leichenspendern (Gruppe B, n=30)
- Lebendspender (Gruppe C, n=50)
- Transplantat-Empfänger vom Lebendspendern (Gruppe D, n=50)

Die Urin- und Blutproben wurden von den Gruppen B, C und D seriell an Tag 0, 1, 3, 5, und 7 nach Transplantation entnommen, von der Gruppe A konnte selbstverständlich nur zum Zeitpunkt der Spende (T0) eine Probe durch ein Explantations-Team unserer Abteilung gesammelt und transferiert werden. Im Serum wurden, neben Entzündungsparametern (CRP, Leukozyten), die korrespondierenden Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen sowie die Immunsuppressiva-(Calcineurin-Inhibitor)-Spiegel bestimmt. Weiter wurden folgende deskriptive Parameter erhoben: Alter, Geschlecht, BMI, Grunderkrankung, kalte und warme Ischämiezeit sowie Diurese in der ersten Stunde nach Transplantation. Weiter wurde, im Falle einer initialen

Transplantatdysfunktion, die Dauer einer möglichen Dialysebehandlung dokumentiert. Unter Berücksichtigung von kritischen Ereignissen in der Beobachtungszeit wurden die Gruppen zusätzlich in folgende fünf Subgruppen unterteilt.

1. Vorliegen einer akuten Abstoßungsreaktion (definiert durch eine Nierenbiopsie oder der Beginn einer Abstoßungstherapie) (Subgruppe 1)
2. Vorliegen einer Calcineurininhibitoren-Toxizität (definiert als ein pathologisch erhöhter Serum-Talspiegel von  $\geq 15$  ng/ml für Tacrolimus und  $\geq 250$  ng/ml für Cyclosporin) (Subgruppe 2)
3. Vorliegen einer akuten Abstoßungsreaktion UND einer Calcineurininhibitoren-Toxizität (Subgruppe 3)
4. Vorliegen einer Delayed Graft Function (definiert durch die Notwendigkeit der Nierenersatztherapie innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation) (Subgruppe 4)
5. Keine der o.g. Ereignisse (Subgruppe 5, Kontrollgruppe)

## **2.2 Materialien**

### **2.2.1 Probengewinnung und Verarbeitung**

Die Probenentnahme erfolgte zu den in dem Studienprotokoll festgelegten Zeitpunkten. Es wurde zu jedem Zeitpunkt ein EDTA-, Serum- sowie Urin-Röhrchen (jeweils 10ml) asserviert. Bei den präoperativen Urinproben handelt es sich um Spontanurin, wobei die Proben der Leichenspender aus einem Blasenkatheter gewonnen wurden. Die Biomarker wurden nach der Transplantation in dem Urin der Transplantatniere, der sich direkt über eine im Transplantat liegenden Mono – J – Harnleiterschleife gewinnen ließ, untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde sofort für 8 Minuten bei 4°C und 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurde das Material in Kyroröhrchen aliquotiert und anschließend bei -80°C bis zur Auswertung tiefgefroren und gelagert.

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

In der Tabelle 2 sind die zur Verarbeitung und Aufbewahrung von Proben verbrauchten Materialien aufgeführt.

Produkt	Hersteller
CyroPure Gefäß 1,8ml weiß	Sarstend
Mikropipetten 1000	Eppendorf
Pipettenspitzen 1000 blau	Sarstend
Konisches Röhrchen 15ml	Falcon
Handschuhe Mikro-Touch	Ansell
Zentrifuge Megafuge 11R	Thermo
Gerfierschrank Hera freeze	Thermo

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

### 2.2.3 Software

- Word, Microsoft
- Excel, Microsoft
- SPSS, IBM
- Prism 6, GraphPad
- T-Base-Transplantationsdatenbank, Charite

## 2.3 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Bestimmung des Glutathion-S-Transferase im Urin wurde von der Firma Argutus Medical Ltd, einem Tochterunternehmen der EKF Diagnostics, in Dublin durchgeführt. Die Untersuchungsproben wurden dazu auf Trockeneis verpackt und versendet.

Der Argutus AKI Test Assay ist ein multiplexed sandwich Immunassay, d.h. mehrere Analyte wurden auf derselben Platte gemessen (67). Ein Spektrum an Antikörpern wurde appliziert, die mit den jeweiligen GST-Partikeln spezifisch reagierten. Nach der Hinzugabe einer „Stopp“-lösung und dem wiederholten Waschen mit Phosphatpufferlösung (Phosphate-buffered saline (PBS)) wurden markierte Antikörper dazu gegeben. Anschließend wurde ein „Read Buffer“ in die „Wells“ zugeführt und die Konzentration in einem sog. ELISA-Reader spektrometrisch gemessen. Der Argutus AKI Test Assay ist hoch spezifisch für GST und zeigt keine Kreuzreaktion zwischen  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST. In Bezug auf den Referenzbereich von GST empfiehlt der Hersteller die

Bestimmung eines eigenen Referenzbereichs der jeweiligen Studiengruppe. Die Referenzbereiche der untersuchte Biomarker wurden aus den präoperativen Werten in den gesunden Lebendspendern errechnet. Für  $\alpha$ -GST lagen diese zwischen 2,76 – 7,67ng/mg uCrea und für  $\pi$ -GST zwischen 5,14 – 13,07ng/mg uCrea.

## **2.4 Statistik**

Um natürliche Schwankungen in der Konzentration der Urinproben zu berücksichtigen, wurden die untersuchten Biomarker gegen den jeweiligen Kreatininwert im Urin normiert. Die daraus resultierende Einheit war ng/mg uCrea. Aus den quantitativen Daten wurden der jeweiligen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung errechnet und diese Ergebnisse weiter statistisch analysiert und graphisch aufgearbeitet. Um die statistische Signifikanz zwischen zwei Variablen zu überprüfen, wurde ein non-parametrischer Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Zur Analyse mehrerer Variablen wurde ein Two-Way-ANOVA verwendet. Hierbei wurden als post-hoc Analyse der Subgruppen ein Tukey und Holm-Sidak Test angewendet. Zur Errechnung der Spezifität und Sensitivität eines Markers wurden ROC Analysen durchgeführt. Anhand dessen wurde mit Hilfe einer Excel Tabelle ein sog. Youden Index kalkuliert, um die cut-off-Werte zu bestimmen. Des weiteren wurde anhand der errechneten cut-off-Werte eine Überlebens-Analyse durchgeführt. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  definiert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3. 1. Demographische Daten**

Es wurden 80 Patienten an dem Standort Campus Virchow Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin in die Studie eingeschlossen. Alle Probanden haben an die Gesamtdauer der Studie teilgenommen. Bis zum Studienende kam es weder zu einem Ausschluss noch zu einem Widerruf der Einverständniserklärung von Patienten. Die demographischen Daten der einzelnen Patientengruppen (Gruppe A-D) sind in der Tabelle 3 gezeigt. Es gab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Alters zwischen den Spendergruppen. Im Gegensatz dazu waren die Empfänger von Leichenspenderorganen signifikant älter als die Lebendspende-Empfänger. Hinsichtlich des Geschlechts und BMI bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Erwartungsgemäß waren kalte aber auch warme Ischämiezeiten bei der Leichen- im Vergleich zur Lebendspende signifikant erhöht.

	Geschlecht [m/f]	Alter [Jahre] M.W. ± S.D. S.W. (p)	BMI [kg/m <sup>2</sup> ] M.W. ± S.D. S.W.	CIT [min] M.W. ± S.D. S.W. (p)	WIT [min] M.W. ± S.D. S.W. (p)
Gruppe A: Hirntote Spender, n=30	11/19  (n.s.)	58,3 ± 15,3 25 – 82 (n.s.)	27,3 ± 6,5 19.1 – 45 (n.s.)		
Gruppe B: Empfänger vom Leichenspendern, n=30	22/8  (n.s.)	58,4 ± 12,6 25 - 78 (p=0,0067 vs. D)	26,4 ± 4,1 19.4 – 34.5 (n.s.)	613.7 ± 269,0 350 – 1745 (p<0,0001 vs. D)	34,7 ± 11,1 20 – 65 (p<0,0001 vs. D)
Gruppe C: Lebendspender, n=50	22/28  (n.s.)	53,5 ± 10,2 25 – 78 (n.s.)	25,3 ± 3,2 18 - 35.6 (n.s.)		
Gruppe D: Empfänger vom Lebendspendern, n=50	35/15  (n.s.)	47,6 ± 15 18 – 91 (p=0,0067 vs. B)	25,8 ± 4,9 17.6 – 41.9 (n.s.)	193,0 ± 61,8 105 – 480 (p<0,0001 vs. B)	23,4 ± 7,4 12 – 55 (p<0,0001 vs. B)

Tabelle 3: m = Mann / f = Frau / M.W. = Mittelwert / S.D. = Standardabweichung / S.W. = Spannweite / p = p-value / BMI = Body mass index / CIT = kalte Ischämiezeit / WIT = warme Ischämiezeit/ n.s. = nicht signifikant

Die häufigste Indikation für eine Nierentransplantation war in beiden Empfängergruppen eine Glomerulonephritis (41,3%), gefolgt von einer vaskulären Nephropathie (20%) sowie einer polyzystischen Nierenerkrankung (6,3%). In zwei Fällen war die langjährige Einnahme von Calcineurininhibitoren nach Herztransplantation ursächlich für die terminale Niereninsuffizienz. Unter „Andere“ wurden seltene Krankheitsbilder wie ein Morbus Ormund oder Wilms-Tumor erfasst (s. Abbildung 3).

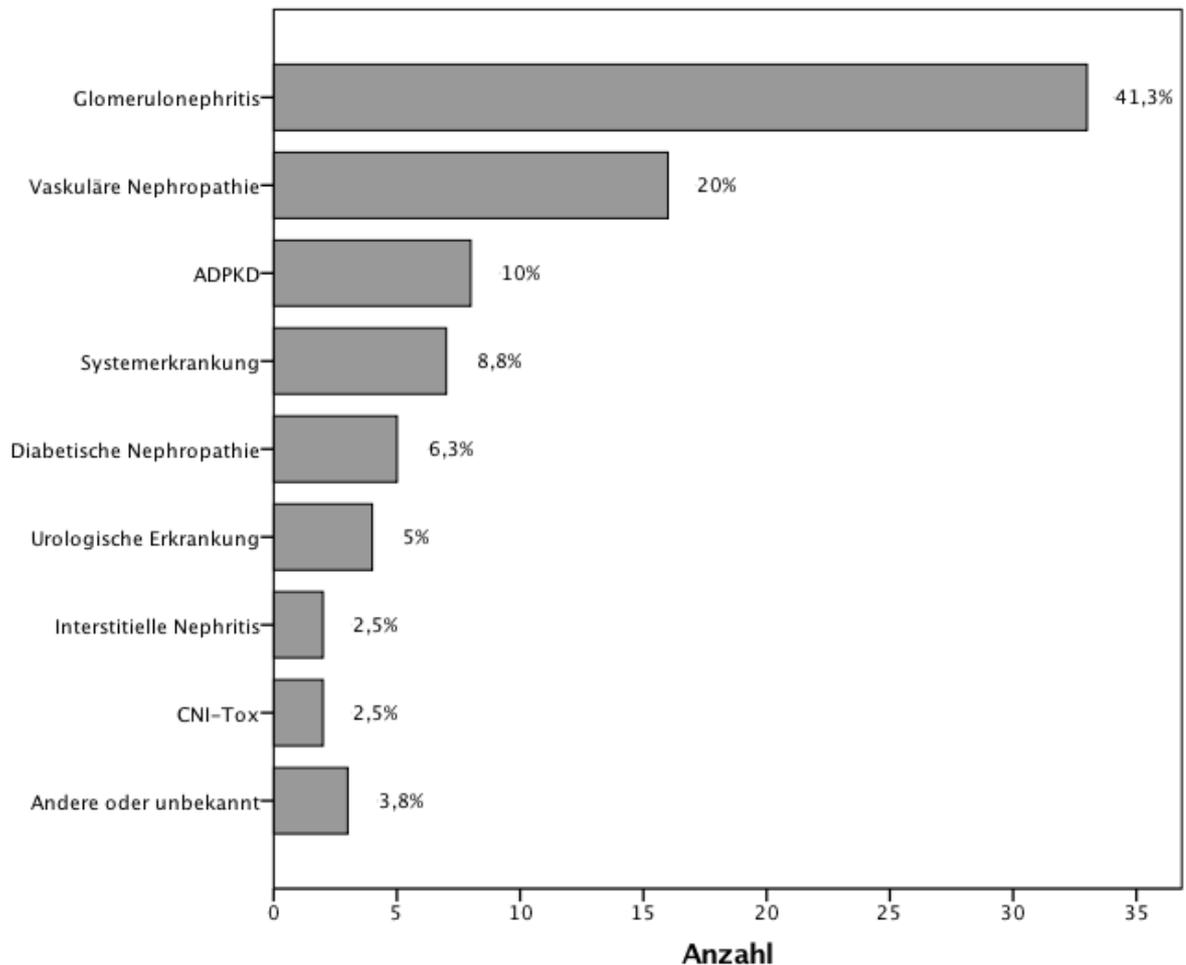


Abbildung 3. Grunderkrankungen für eine Transplantation

### 3.2 Nierenfunktion (Kreatinin und GFR)

Das Serum-Kreatinin wurde mittels standardisierter Jaffé-Methode laborchemisch bestimmt und die eGFR mit der MDRD-Formel berechnet. Nach Organimplantation wurde die Transplantatfunktion anhand der Retentionswerte und Menge der Urinausscheidung dokumentiert. Zusätzlich wurde die Nierenfunktion der Lebendspender nach (einseitiger) Nephrektomie erfasst.

### 3.2.1 Leichenspender

Die Spender (Gruppe A, n=30) waren zwischen 25 und 82 Jahre alt, 11 (37%) davon waren männlich und 19 (63%) weiblich. Der durchschnittliche BMI lag bei  $27,3 \pm 6,5$   $\text{kg/m}^2$ . Die Serum-Kreatininwerte der Leichenspender lagen zwischen 0,31 mg/dl und 1,45mg/dl, der Mittelwert und die Standardabweichung bei  $0,81 \pm 0,29$  mg/dl. Die eGFR schwankten zwischen 37,1 und 185,5ml/min, der Mittelwert lag bei  $95,9 \pm 39$  ml/min. Die durchschnittliche Diurese der letzten Stunde vor Operation betrug  $152 \pm 16$  ml/h. Die häufigste Todesursache der Spender war eine Subarachnoidalblutung (40%), gefolgt von einer intrazerebralen Blutung (26,6%).

### 3.2.2 Leichenspende-Empfänger

In der Abbildung 4 sind der Verlauf der Kreatininwerte in dem Blut der Leichenspende-Empfänger (Gruppe B) anhand des Mittelwerts und des SEM dargestellt. Hier zeigte sich vor allem am 5. und 7. Tag nach Transplantation ein signifikanter Anstieg der GFR Mittelwerte ( $p < 0,0001$ ). Der Kreatininmittelwert fiel von präoperativ (d0)  $6,83 \pm 1,98$  mg/dl stetig auf  $4,47 \pm 2,21$  mg/dl am 7. postoperativen Tag (POD). Signifikante Unterschiede der Kreatininwerte zwischen den Studientagen wurden nicht verzeichnet.

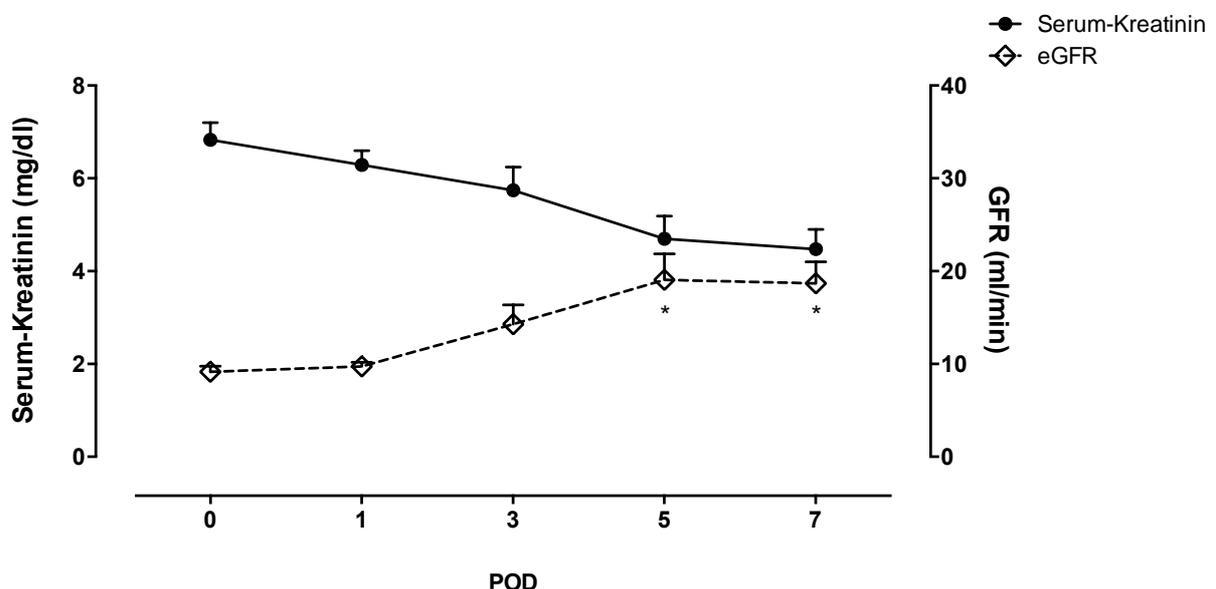


Abbildung 4. Nierenfunktion Leichenspende-Empfänger (Gruppe B) vor/nach NTx, Verlauf Serum-Kreatinin und GFR (\*:  $p < 0,05$ )

In dem Patientenkollektiv wurde bei 16 (53,4%) der von Leichenspendern transplantierten Nieren (n=30) bereits intraoperativ eine Urinproduktion beobachtet. Im Verlauf der ersten Woche nach Transplantation wurde in vier (13,4%) Fällen eine akute Abstoßung durch eine Biopsie gesichert und dementsprechend, je nach Rejektionsgrad, mit einer Urbason-Stoßtherapie±Thymoglobulin behandelt (Subgruppe 1). Weitere fünf (16,7%) Patienten zeigten eine Calcineurin-inhibitor-assoziierte Toxizität, die sich aus den erhöhten Talspiegeln der Immunsuppressiva ableiten ließ (Subgruppe 2). Im Weiteren war bei drei (10%) der Untersuchten sowohl eine Abstoßungsreaktion als auch eine CNI-Toxizität aufgetreten (Subgruppe 3). Neun Patienten (30%) zeigten trotz fehlendem Nachweis einer Abstoßungsreaktion oder einer Toxizität eine verzögerte Transplantatfunktion (delayed-graft-function), sodass eine Dialyse im Zeitraum von 1-7 Tagen nach Transplantation notwendig war (Subgruppe 4). Letztlich zeigte sich nur bei neun (30%) der erfassten Patienten ein ereignisloser unkomplizierter Verlauf mit durchgängig guter Transplantatfunktion (Subgruppe 5). Die Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Kreatininmittelwerte in den einzelnen Gruppen. Insgesamt waren die Kreatininwerte bei Patientin mit einem Ereignis höher als in der „ereignislosen“ Subgruppe 5; in den Subgruppen 3 und 4 waren diese Unterschiede signifikant.

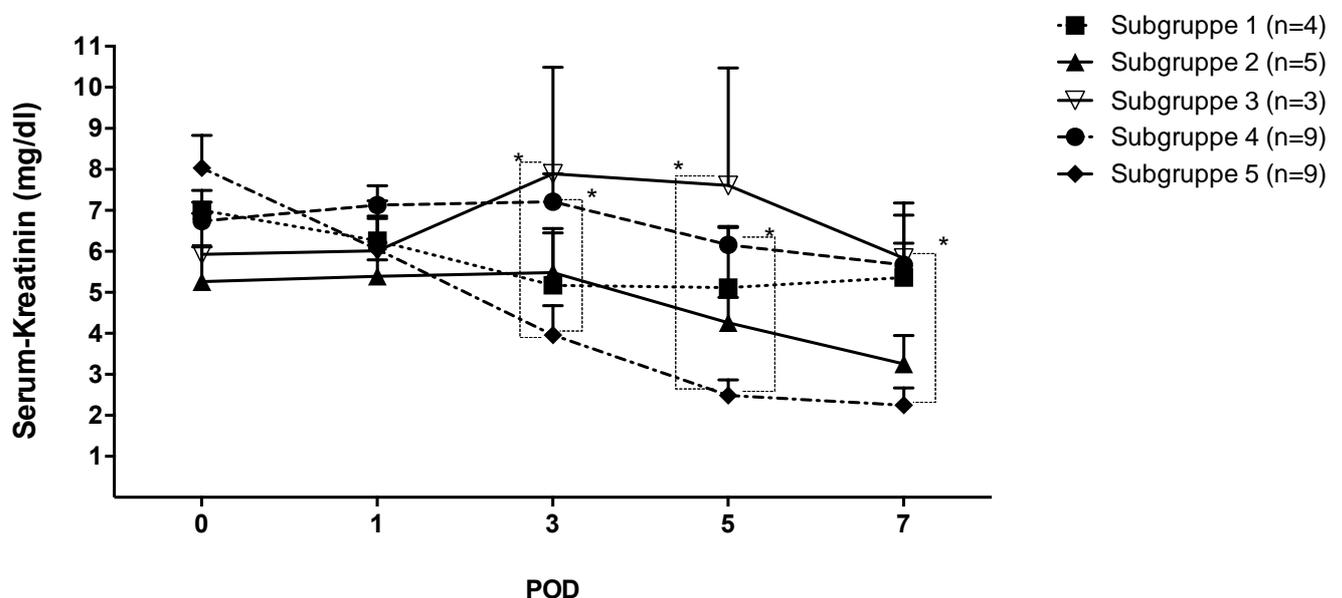


Abbildung 5. Nierenfunktion Leichenspende-Empfänger (Gruppe B) vor/nach NTx: Verlauf Serum-Kreatinin der einzelnen Subgruppen (\*:  $p < 0,05$ , Subgruppe 1: akute Rejektion, Subgruppe 2: CNI Toxizität, Subgruppe 3: akute Rejektion + CNI Toxizität, Subgruppe 4: DGF, Subgruppe 5: Kontrollgruppe)

### 3.2.3 Lebendspender

Das Alter der Lebendspender (Gruppe C) lag zwischen 25 und 78 Jahre und die präoperativen Kreatininwerte zwischen 0,47 und 1,24mg/dl. Die Nierenfunktion der Lebendspender wurde bis Tag 7 nach Nephrektomie weiterverfolgt, Abbildung 6 zeigt den Verlauf anhand des Mittelwerts $\pm$ SEM von Serum-Kreatinin und eGFR. So betrug der präoperative Mittelwert der eGFR 96,72ml/min und fiel auf 56.45ml/min am ersten Tag nach Nephrektomie ab. Dabei stieg der Kreatininmittelwert von 0,78mg/dl (präoperativ) auf 1,25mg/dl am 1. POD an. Am 3. POD lag er mit 1,19mg/dl etwas geringer. Elf (22%) von den 50 untersuchten Lebendspendern hatten am ersten postoperativen Tag eine Verminderung der eGFR um mindestens 50% des Ausgangswerts. In keinen Fall kam es zu chirurgischen Komplikationen, Interventionen oder operativen Revisionen.

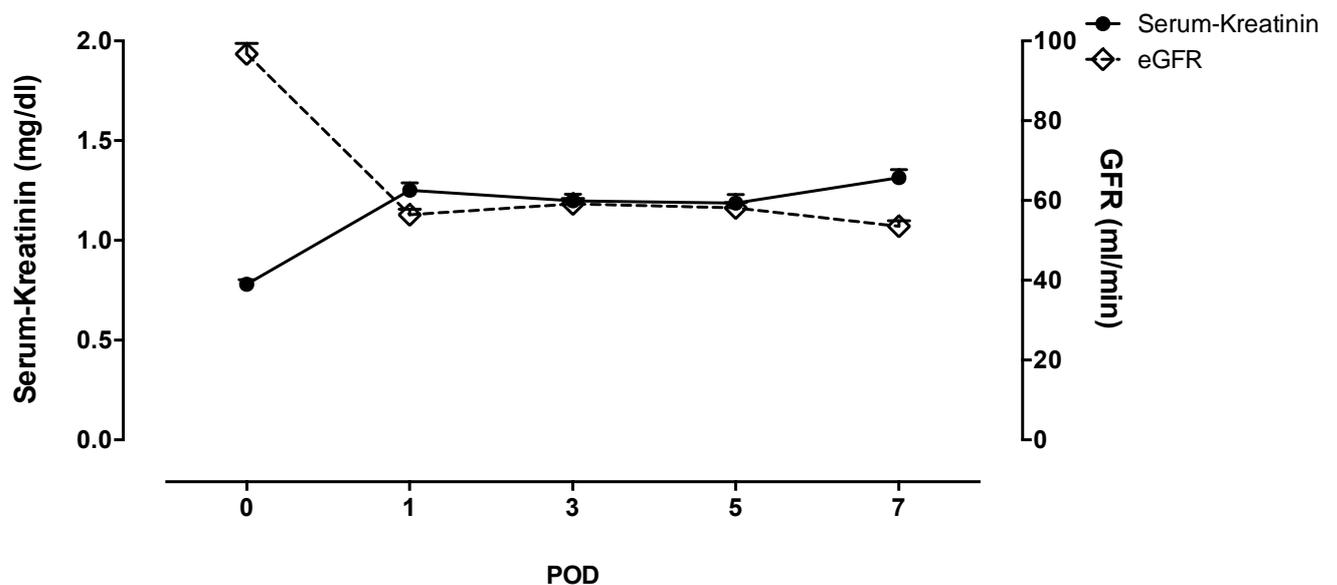


Abbildung 6. Nierenfunktion Lebendspender (Gruppe C) vor/nach Nephrektomie: Verlauf Serum-Kreatinin und eGFR

### 3.2.4 Lebendspende-Empfänger

Im gesamten Verlauf ließ sich in der Gruppe der Lebendspende-Empfänger ein statistisch nicht signifikanter und kontinuierlicher Abfall der Kreatininwerte feststellen, während der Anstieg der GFR an allen Messtagen signifikant war (Abb. 7). Das Serum-Kreatinin sank am ersten Tag nach Transplantation von einem Mittelwert von  $7,79 \pm 2,68$  mg/dl auf  $4,69 \pm 1,86$  mg/dl und betrug am 7. POD schließlich im Mittel  $2,37 \pm 1,43$  mg/dl.

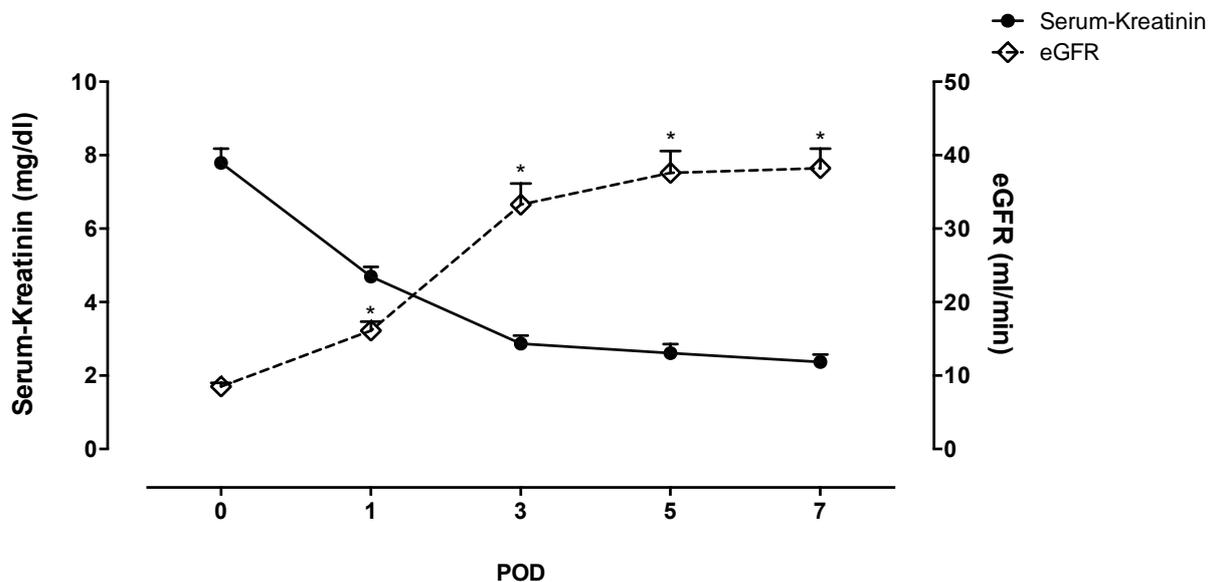


Abbildung 7. Nierenfunktion Lebendspende-Empfänger (Gruppe D) vor/nach NTx: Verlauf Serum-Kreatinin und eGFR (\*:p<0,05)

Bei allen 50 Lebendspende-Empfängern zeigte sich bereits intraoperativ eine Urinproduktion durch das Transplantat. Eine akute Abstoßung trat bei acht (16%) der Patienten auf (Subgruppe 1), wobei weitere zwölf (24%) eine Calcineurin-Inhibitor-assoziierte Toxizität (Subgruppe 2) und drei (6%) Patienten sowohl eine Abstoßungsreaktion als auch eine CNI-Toxizität hatten (Subgruppe 3). Bei 27 (54%) der Nierentransplantatempfänger von Lebendspendern kam es zu keinem Ereignis (Subgruppe 5). Abb. 8 zeigt den Kreatinin-Verlauf der jeweiligen Subgruppen. In Vergleich mit der Subgruppe 5 hatte keine der Ereignis-Subgruppen signifikante Unterschiede der Kreatininwerte. im Serum.

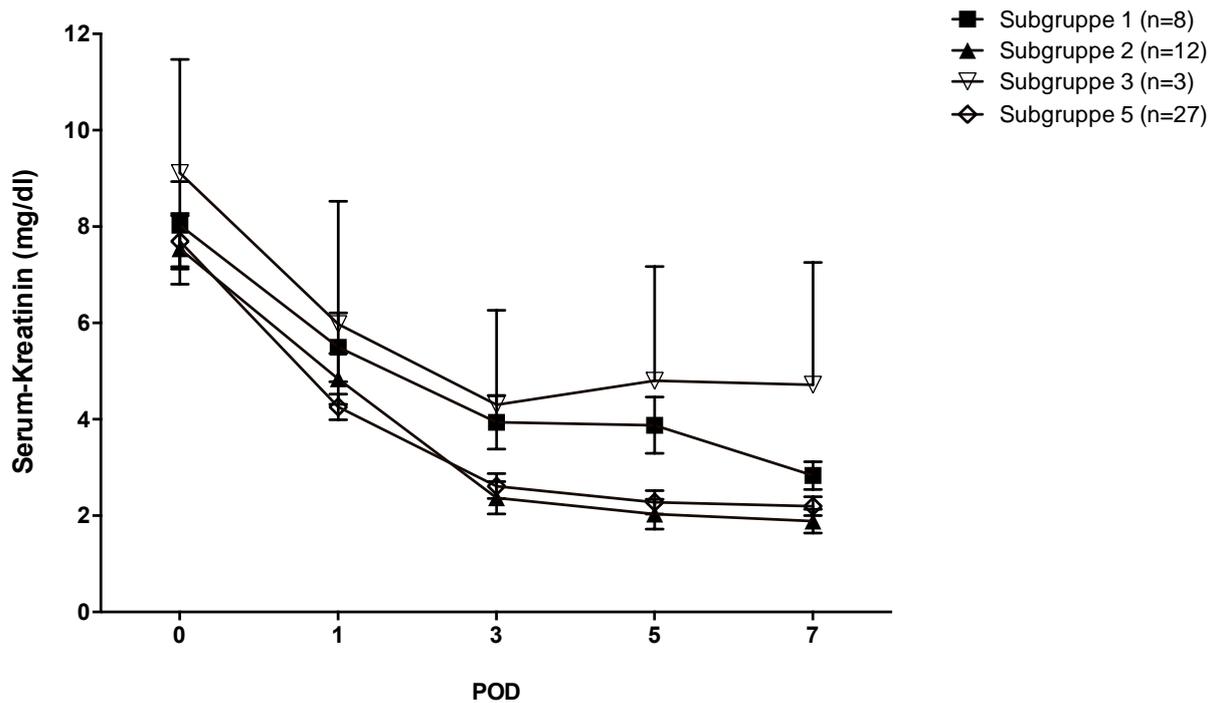


Abbildung 8. Nierenfunktion Lebendspende-Empfänger (Gruppe D) vor/nach NTx: Verlauf Serum-Kreatinin der einzelnen Subgruppen (Subgruppe 1: akute Rejektion, Subgruppe 2: CNI Toxizität, Subgruppe 3: akute Rejektion + CNI Toxizität, Subgruppe 4: DGF, Subgruppe 5: Kontrollgruppe)

Verglichen mit der eGFR nach einer Transplantation von Leichenspendern zeigten erwartungsgemäß Lebendspende-Empfänger eine signifikant bessere Transplantatfunktion innerhalb des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen (Abb. 9).

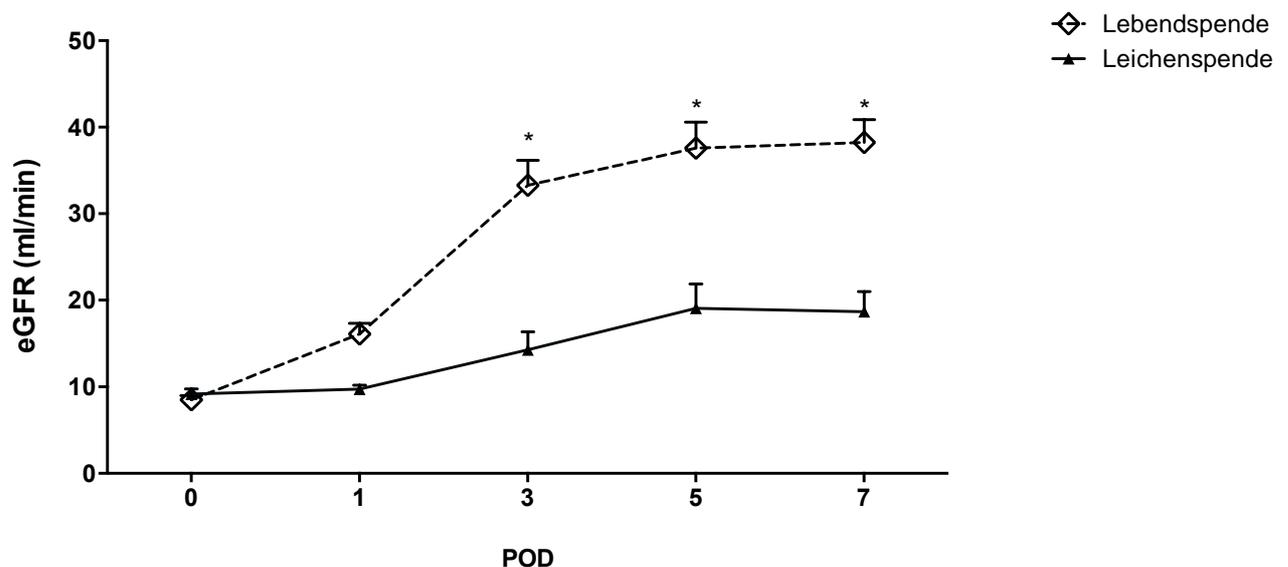


Abbildung 9. Nierenfunktion Leichenspende-/Lebendspende-Empfänger (Gruppe B und D): Verlauf eGFR (\* p<0,0001)

### 3.3 Immunsuppressivaspiegel

Alle Patienten erhielten entsprechend dem Standardschema unseres Zentrum neben einer Induktionstherapie mit einem IL-2-Rezeptor-Antikörper (Simulect) eine Dreifach-Kombination, bestehend aus Glukokortikoiden, Mycophenolat Mofetil (MMF) sowie einem Calcineurin-Inhibitor (Cyclosporin A oder Tacrolimus) zur Immunsuppression. Der 24h-Talspiegel der Calcineurin-Inhibitoren wurde täglich im Blut der Empfänger gemessen. Eine Calcineurin-Inhibitor assoziierte Nephrotoxizität wurde definiert als ein pathologisch erhöhter Talspiegel von  $\geq 15$  ng/ml für Tacrolimus und  $\geq 250$  ng/ml für Cyclosporin im Serum.

Während alle Leichenspende-Empfänger zur Immunsuppression Tacrolimus erhielten, wurden 16 von 50 (32%) Lebendspender-Empfänger mit Cyclosporin behandelt, davon wurden jedoch drei (6%) Patienten aufgrund einer akuten Abstoßungsreaktion sowie extrem schwankender Blutspiegel innerhalb der ersten Woche nach Transplantation von Cyclosporin auf Tacrolimus umgestellt. Die Mittelwerte der Talspiegelkonzentrationen der Immunsuppressiva sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Tacrolimus-Spiegel der beide Empfängergruppen zeigen an allen Studientagen keine signifikante Unterschiede.

	<b>Leichenspende-Empfänger</b>	<b>Lebendspende-Empfänger</b>	
	Tacrolimus (n=30) (ng/ml) MW $\pm$ SD	Cyclosporin (n=16) (ng/ml) MW $\pm$ SD	Tacrolimus (n=34) (ng/ml) MW $\pm$ SD
<b>Tag 1</b>	11,50 $\pm$ 6,01	239,30 $\pm$ 134,80	11,38 $\pm$ 6,08
<b>Tag 3</b>	9,13 $\pm$ 5,08	265,70 $\pm$ 286,40	12,23 $\pm$ 16,23
<b>Tag 5</b>	9,31 $\pm$ 3,91	155,90 $\pm$ 74,69	7,53 $\pm$ 3,88
<b>Tag 7</b>	7,47 $\pm$ 2,36	197,10 $\pm$ 93,81	9,42 $\pm$ 11,28

Tabelle 4: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Serum-Spiegel von Tacrolimus und Cyclosporin in Leichen- und Lebendspende-Empfängern.

### **3.4 Verlauf GST**

#### **3.4.1. Gruppen**

##### **3.4.1.1 Leichenspender (Gruppe A)**

Von den Leichenspendern wurden vor Organentnahme sowohl Blut- als auch Urinproben gewonnen und die Konzentration von  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin gemessen. Um natürliche Schwankungen in der Konzentriertheit des Urins zu berücksichtigen, wurde die untersuchten Biomarker (GST) gegen den jeweiligen Kreatininwert im Urin normiert. Die gemessenen GST-Werte in unserem Patientengut lagen zwischen 0,39ng/mg uCrea und 722,5ng/mg uCrea für das  $\alpha$ -GST sowie zwischen 0,3ng/mg uCrea und 473,9ng/mg uCrea für das  $\pi$ -GST. Weder  $\alpha$ -GST noch  $\pi$ -GST zeigten eine Korrelation zu Spenderalter ( $\alpha$ -GST:  $p = 0,74$ ,  $r = 0,06$  ;  $\pi$ -GST:  $p = 0,40$ ,  $r = -0,15$ ) oder der Diurese innerhalb der letzten Stunde ( $\alpha$ -GST:  $p = 0,10$ ,  $r = 0,32$  ;  $\pi$ -GST:  $p = 0,15$ ,  $r = 0,28$ ). In Abbildung 10 sind die Mittelwerte und SEM in den einzelnen Subgruppen sowie signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen aufgeführt. Die Unterteilung der Subgruppen bei den Leichenspendern erfolgte entsprechend den korrespondierenden Subgruppen der jeweiligen Transplantatempfänger (Subgruppe 1: akute Abstoßung (AR), Subgruppe 2: CNI-Toxizität, Subgruppe 3: AR + CNI-Toxizität, Subgruppe 4: DGF, Subgruppe 5: ohne Ereignis). Im Ergebnis fanden sich niedrigere Konzentrationen von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in den Subgruppen 2 und 5, wobei die Mittelwerte in den Subgruppen 1, 3 und 4 deutlich höhere Standardabweichungen zeigten. Vor allem die  $\alpha$ -GST Werte im Urin der Spender, deren Nieren nach Transplantation eine akute Abstoßung und CNI-Toxizität aufwiesen, waren signifikant höher als in der Subgruppe 5 ( $p=0,022$ ). Die höchsten  $\pi$ -GST Werte wurde in den Leichenspendern gemessen, deren Empfänger eine DGF entwickelten (Subgruppe 4) ( $p=0,07$ ). Im Gegensatz dazu ergaben die Spender-Kreatininwerte, wenn man sie ebenfalls analog dazu nach ihren Empfängersubgruppen stratifizierte, keine relevante Unterschiede.

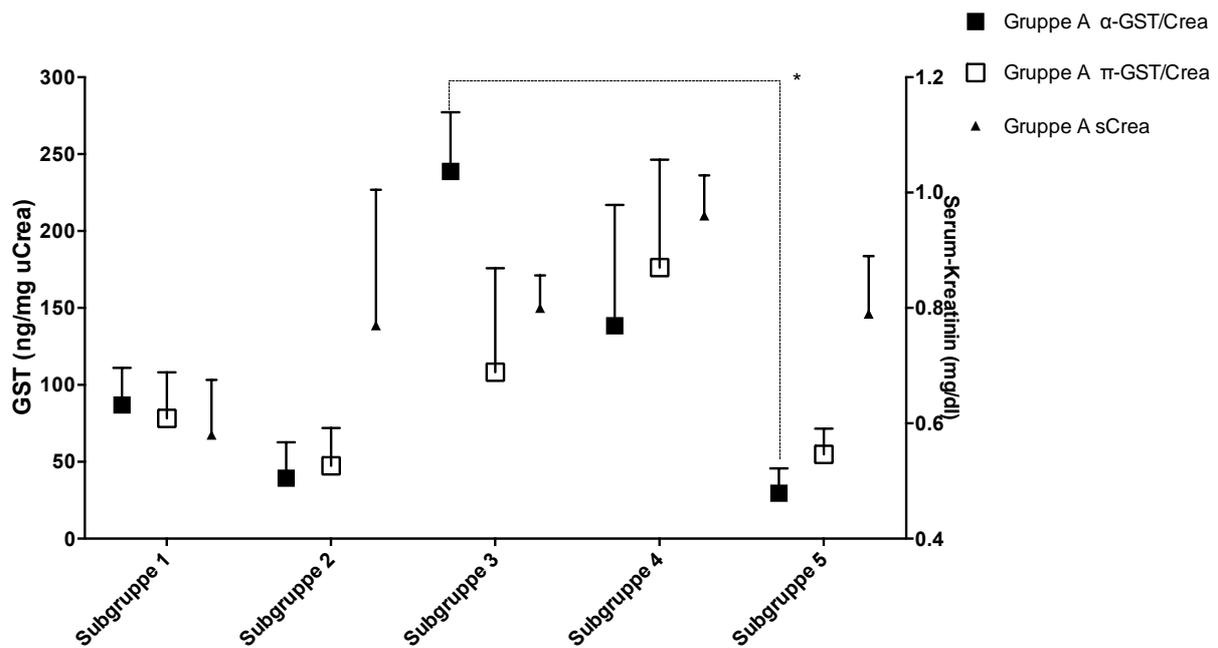


Abbildung 10. Leichenspender (Gruppe A)  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin sowie Serum-Kreatinin unterteilt nach nach klinischen Verläufen der korrespondierenden Empfänger-Subgruppen (\*:  $p < 0,05$ , Subgruppe 1: akute Rejektion, Subgruppe 2: CNI Toxizität, Subgruppe 3: akute Rejektion + CNI Toxizität, Subgruppe 4: DGF, Subgruppe 5: Kontrollgruppe)

In der Receiver Operating Characteristic Analyse (ROC) bewies  $\alpha$ -GST in den Spendern eine Spezifität und Sensitivität von 100% und 77,7% für eine akute Abstoßungsreaktion im Verlauf bei einem cut-off von  $< 33,97$  ng/mg uCrea. In den Abbildungen 11 und 12 ist neben der ROC Kurve die Survival Kurve der Subgruppe mit akuter Abstoßung in den Leichenspende-Empfängern aufgeführt, in der eine signifikant höhere, abstoßungsfreie Transplantatüberlebensrate dargestellt wird, wenn  $\alpha$ -GST unterhalb des cut-offs liegt. Bei 3 Patienten in der Subgruppe 3 konnte hierbei keine Survival Analyse durchgeführt. Die Survival Analyse der Subgruppe 4 in den korrespondierenden Leichenspende-Empfängern zeigte keine signifikante Unterschiede.

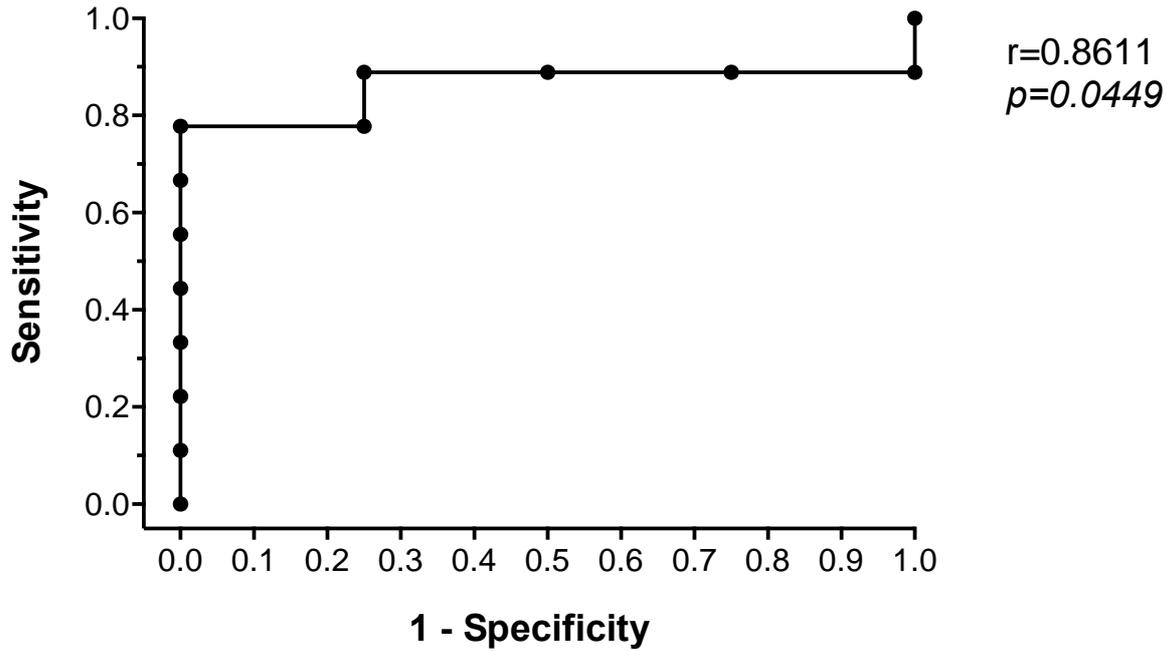


Abbildung 11. ROC Kurve:  $\alpha$ -GST (Spenderwerte) mit akuter Abstoßung bei den korrespondierenden Empfängern (Subgruppe 1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe 5, n=9) der Leichenspende-Empfänger (Gruppe A)

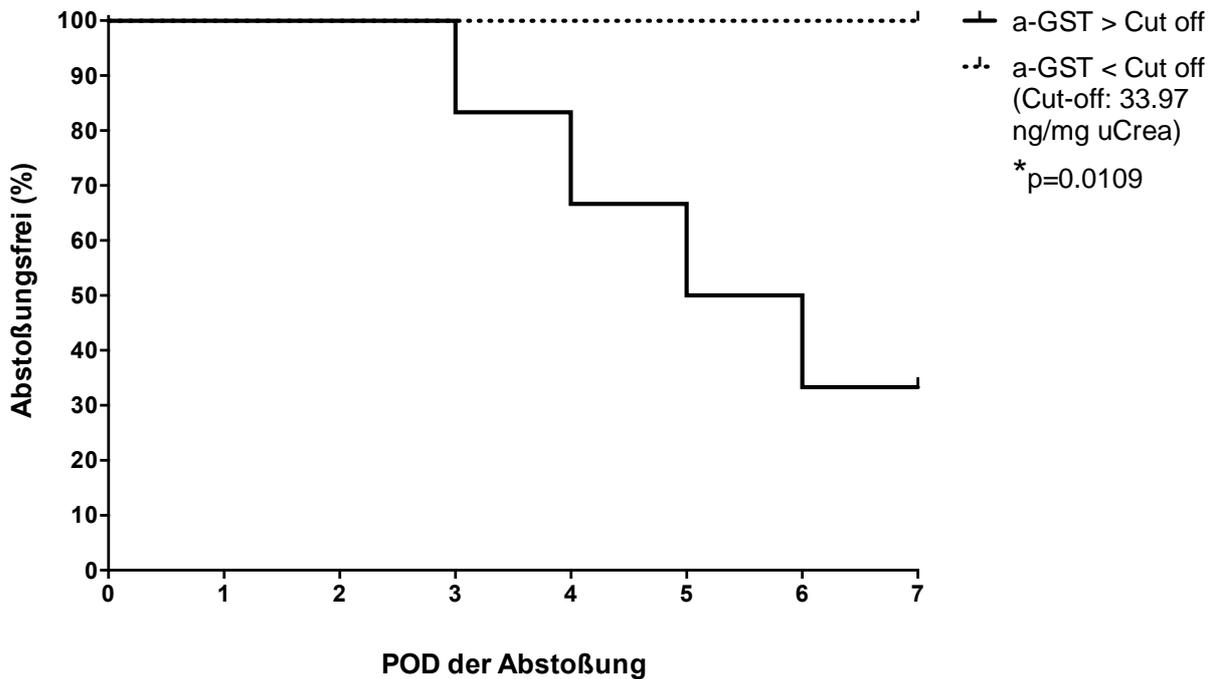


Abbildung 12. Survival Kurve:  $\alpha$ -GST (Spenderwerte) mit akuter Abstoßung der korrespondierenden Empfänger (Subgruppe 1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe 5, n=9) der Leichenspende-Empfänger (Gruppe A)

### 3.4.1.2 Leichenspende-Empfänger (Gruppe B)

Im gesamten Patientenkollektiv lag die Konzentration von  $\alpha$ -GST zwischen 0,1 und 1577ng/mg uCrea und die von  $\pi$ -GST zwischen 0,3 und 804ng/mg uCrea im Urin. Am ersten postoperativen Tag zeigten beide Marker ein Maximum, wobei die  $\pi$ -GST Werte vor Transplantation bereits deutlich höher lagen als die von  $\alpha$ -GST. Im Vergleich zum Serum-Kreatinin (Abb. 13) zeigten die Mittelwerte sowohl von  $\alpha$ - als auch von  $\pi$ -GST bereits am 3. POD einen signifikanten Abfall. Dabei fielen die  $\alpha$ -GST-Werte am Tag 3 bereits in den Bereich des Ausgangswerts und sanken an den Folgetagen weiter. Eine Korrelation zwischen den Verlauf des Serum-Kreatinins und den beiden GST-Markern konnte nicht nachgewiesen werden.

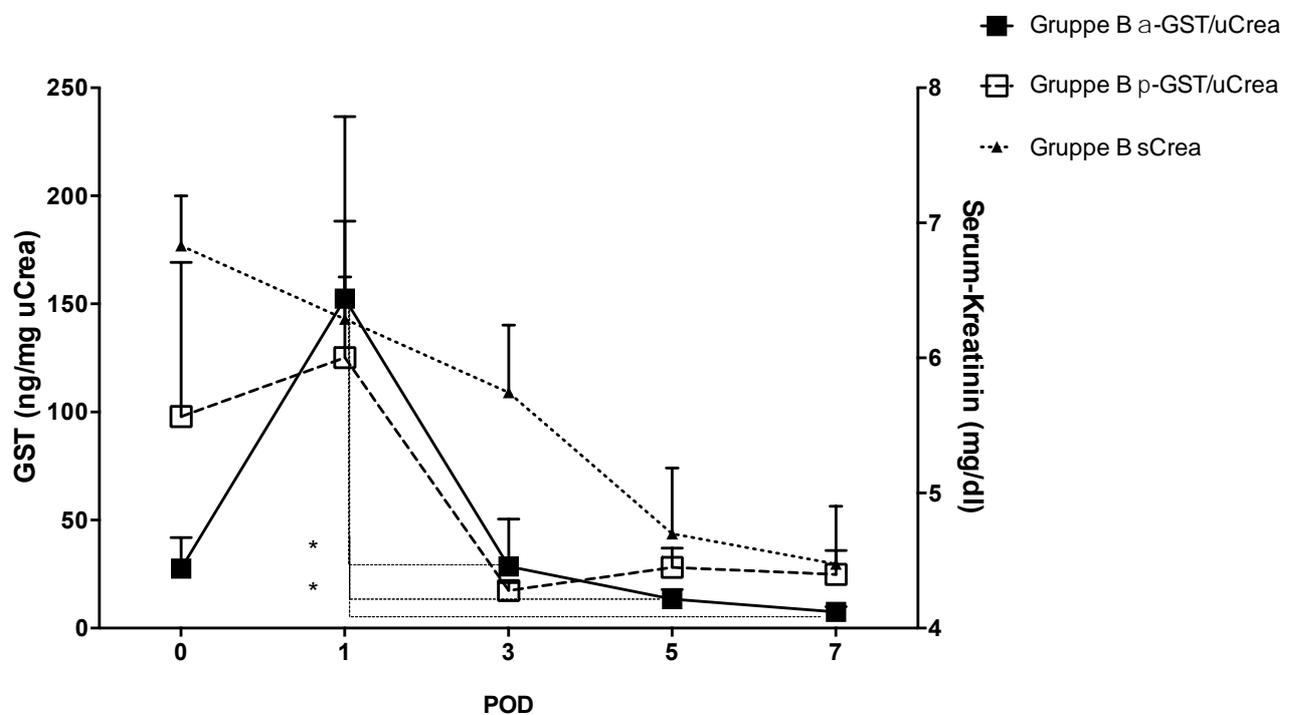


Abbildung 13. Leichenspende-Empfänger (Gruppe B):  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin sowie Serum-Kreatinin (\*:p<0,05)

### 3.4.1.3. Lebendspender (Gruppe C)

Bei den Lebendspendern schwankten die Werte von  $\alpha$ -GST zwischen 0,1 und 110ng/mg uCrea und von  $\pi$ -GST zwischen 0,1 und 151,3ng/mg uCrea. Abbildung 14 zeigt die GST-Werte der Lebendspender vor und nach der Spende (einseitige Nephrektomie). Hierbei fand sich ein Anstieg aller drei Marker. Das Serum-Kreatinin blieb an den Folgetagen weiterhin erhöht, wobei  $\pi$ -GST am Tag 7 statistisch signifikant unter den Ausgangswert abfiel.

In Abbildung 15 sind die präoperativen (vor einseitiger Nephrektomie) Mittelwerte der Marker ebenfalls, analog den Leichenspendern, entsprechend den späteren Empfänger-Subgruppen unterteilt. Dabei lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der präoperativen Messung in Korrelation zu den späteren Subgruppen verzeichnen. Im Vergleich zu den korrespondierenden Werten am Tag 0 der Leichenspender waren GST-Werte ( $\alpha$  und  $\pi$ ) bei den Lebendspendern in den Subgruppen 1 und 3 signifikant niedriger ( $\alpha$ -GST:  $p < 0,0001$ ;  $\pi$ -GST: 0,005 bzw. 0,007)

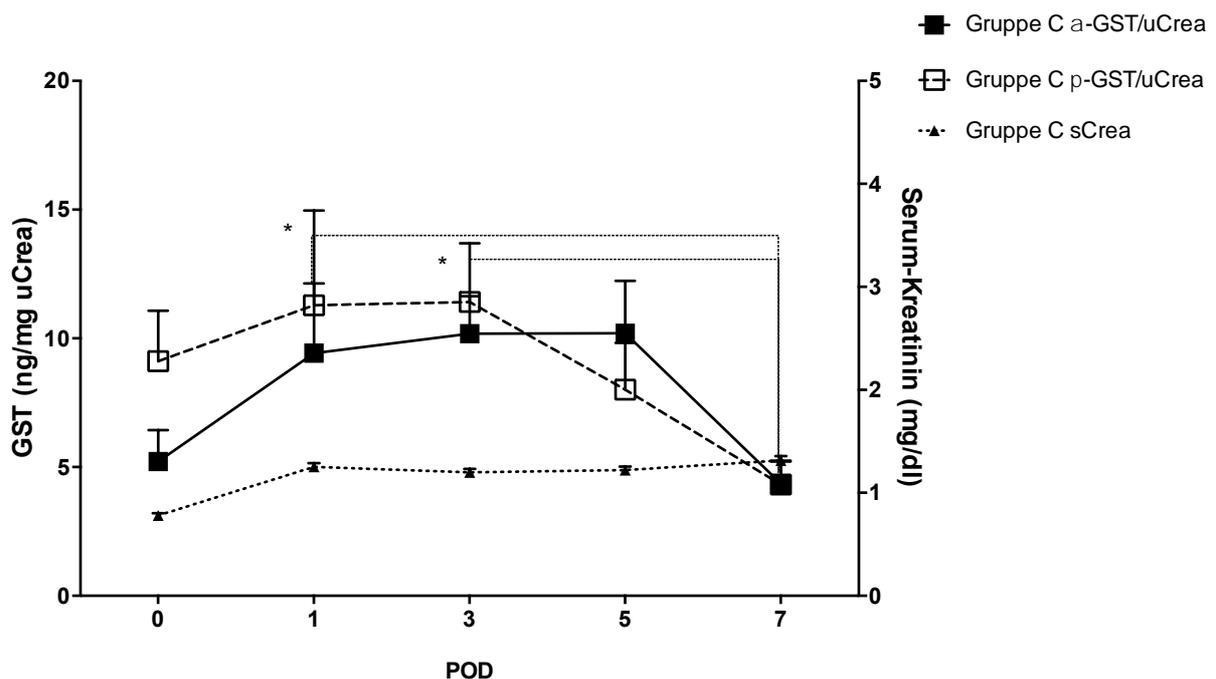


Abbildung 14. Lebendspender (Gruppe C):  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin sowie Serum-Kreatinin (\*:  $p < 0,05$ )

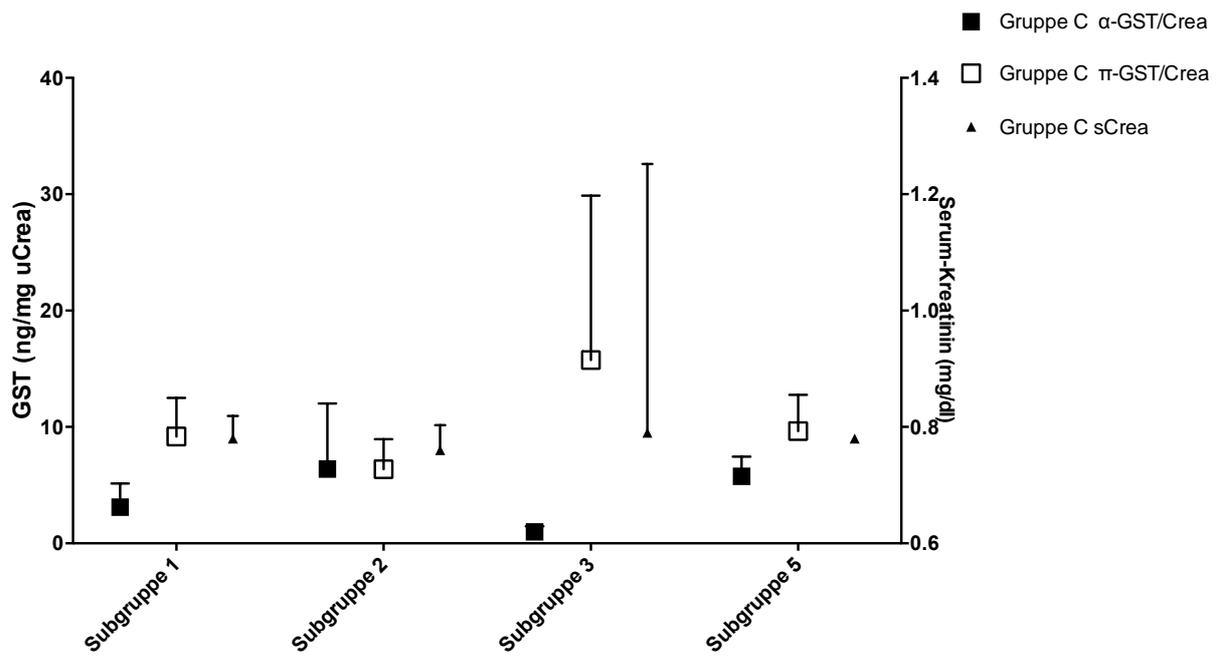


Abbildung 15. Lebendspender (Gruppe C) Tag 0:  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin sowie Serum-Kreatinin unterteilt nach klinischen Verläufen der korrespondierenden Empfänger-Subgruppen (Subgruppe 1: akute Rejektion, Subgruppe 2: CNI Toxizität, Subgruppe 3: akute Rejektion + CNI Toxizität, Subgruppe 5: Kontrollgruppe)

### 3.4.1.4. Lebendspende-Empfänger (Gruppe D)

Die gemessenen Konzentrationen von  $\alpha$ -GST lagen zwischen 0,1 und 766,7ng/mg uCrea und von  $\pi$ -GST zwischen 0,15 und 3194ng/mg uCrea im Urin. Während die  $\pi$ -GST-Werte im Urin vor Transplantation höhere Werte zeigten und an allen weiteren Studientagen signifikant niedriger als der Ausgangswert lagen, waren die  $\alpha$ -GST-Werte bei den Nierentransplantatempfängern von Lebendspendern postoperativ im Vergleich zum präoperativen Wert nicht signifikant verändert. Die  $\pi$ -GST Verlaufskurve wies in dieser Patientengruppe eine positive Korrelation zu den Serumkreatininwerten auf ( $p=0.015$ ,  $r=0.95$ )

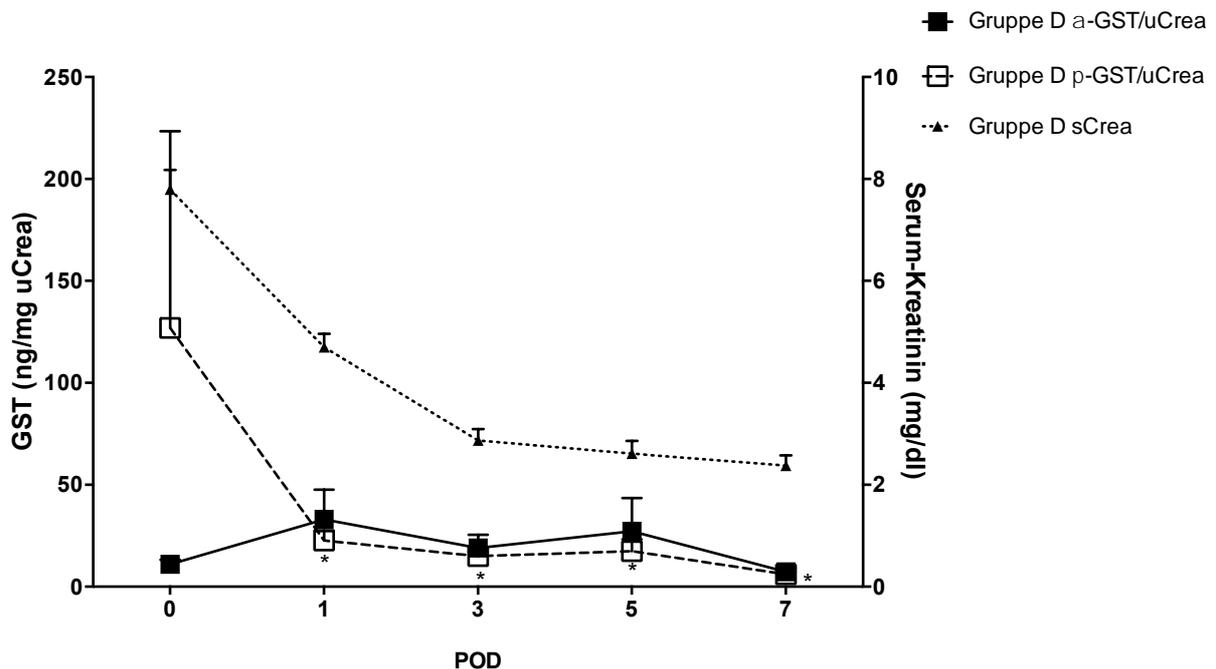


Abbildung 16. Lebendspende-Empfänger (Gruppe D):  $\alpha$ -GST und  $\pi$ -GST im Urin sowie Serum-Kreatinin (\*:  $p < 0,05$ )

### 3.4.2. Subgruppen der Empfänger (Vergleich Lebend- versus Leichenspende)

Um mögliche Veränderungen der jeweiligen Isotypen ( $\alpha$ ,  $\pi$ ) von GST während eines bestimmten Ereignis nach Transplantation darzustellen, wurden die GST Verläufe in den weiteren Subgruppen analysiert.

#### 3.4.2.1. Akute Abstoßungsreaktion (Subgruppe 1)

Der Verlauf von GST in den Empfängern mit einer akuten Rejektion ist in der Abbildung 17 und 18 gezeigt, die den postoperativen Verlauf von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST zwischen Leichen- und Lebendspendern vergleicht. Bei einer Transplantatabstoßung zeigte sich im postoperativen Verlauf weder für  $\alpha$ - noch für  $\pi$ -GST eine signifikante Änderung, Die Mittelwerte lagen zwischen 2,8 und 473,5ng/mg uCrea beim  $\alpha$ -GST und 3,3 und 477,8ng/mg uCrea beim  $\pi$ -GST. Im Vergleich zu den Lebendspender-Empfängern war sowohl die  $\alpha$ - als auch  $\pi$ -GST bei den Leichenspender-Empfängern am 1. POD signifikant höher ( $\alpha$ -GST:  $p = 0,01$ ;  $\pi$ -GST:  $p = 0,005$ ). Hier sanken die Mittelwerte aber im Verlauf stetig ab und erreichten am 7. POD die niedrigsten Messungen (statistisch nicht signifikant). In den Lebendspender-Empfängern blieben die Werte von beiden GST-Isotypen über den gesamten Beobachtungszeitraum in einem niedrigen Bereich.

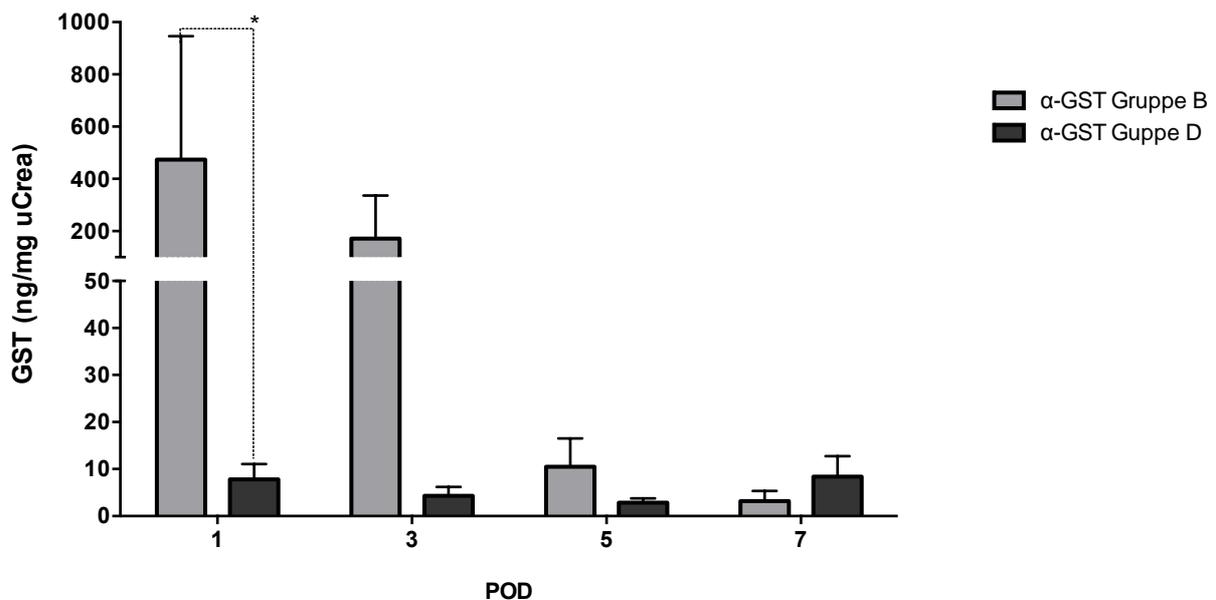


Abbildung 17. Verlauf der  $\alpha$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspender-Empfängern (Gruppe D) bei akuter Abstoßungsreaktion (Subgruppe 1)

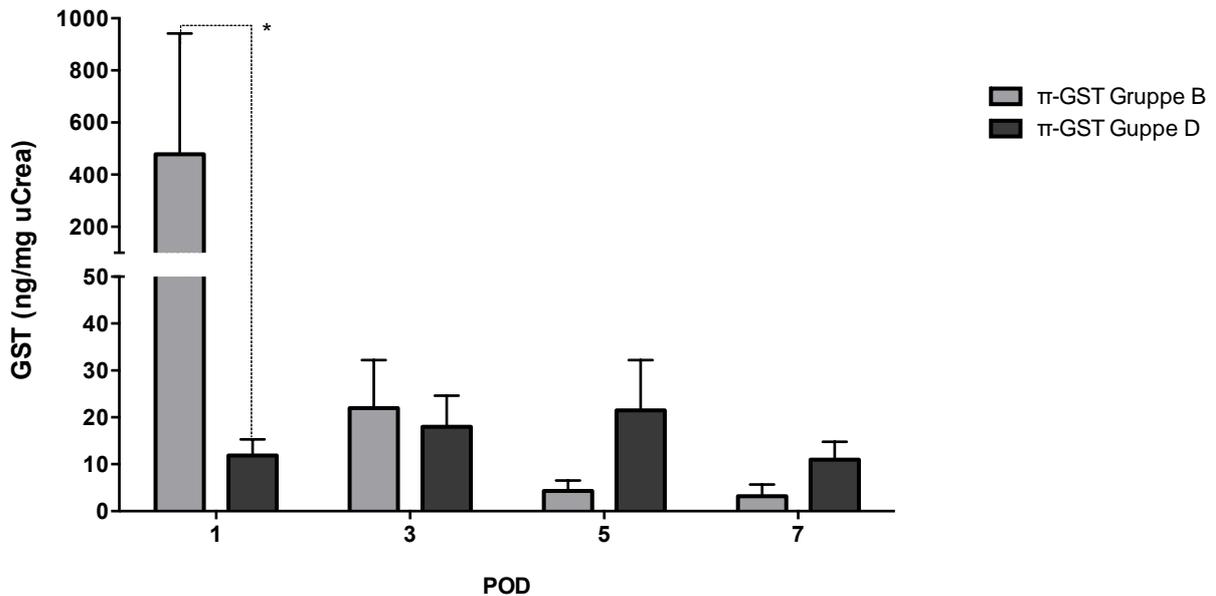


Abbildung 18. Verlauf der  $\pi$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende-Empfängern (Gruppe D) bei akuter Abstoßungsreaktion (Subgruppe 1)

### 3.4.2.2. Calcineurin-induzierte Nephrotoxizität (Subgruppe 2)

Eine nephrotoxische Nebenwirkung der Immunsuppression auf das Transplantat, definiert über einen pathologisch erhöhten Talspiegel von  $\geq 15$  ng/ml für Tacrolimus und  $\geq 250$  ng/ml für Cyclosporin im Serum, wurde am häufigsten zum Zeitpunkt Tag 1 nach Transplantation festgestellt. In Falle einer CNI-Toxizität waren alle GST-Werte am ersten Tag signifikant erhöht, wobei die  $\alpha$ -GST Werte höher lagen als die für  $\pi$ -GST. Die höchsten Werte für  $\alpha$ -GST fanden am Tag 1 sich ebenfalls in der Gruppe der Leichenspender-Empfänger mit einem Mittelwert von 316,6ng/mg uCrea und die niedrigsten am Tag 3 (2,9 ng/mg uCrea). Die  $\pi$ -GST-Werte lagen an Tag 1 bis 5 zwischen 2,8 und 73,3ng/mg uCrea.

Leichenspender- und Lebendspender-Empfänger der gleichen Subgruppe zeigten hier für  $\alpha$ -GST am Tag 1 signifikante Unterschiede mit deutlich höheren Werten bei den Leichenspende-Empfängern. In dem weiteren postoperativen Verlauf fielen diese Werte in beiden Gruppen ab, und unterschieden sich nicht mehr signifikant. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Ergebnisse der Subgruppe.

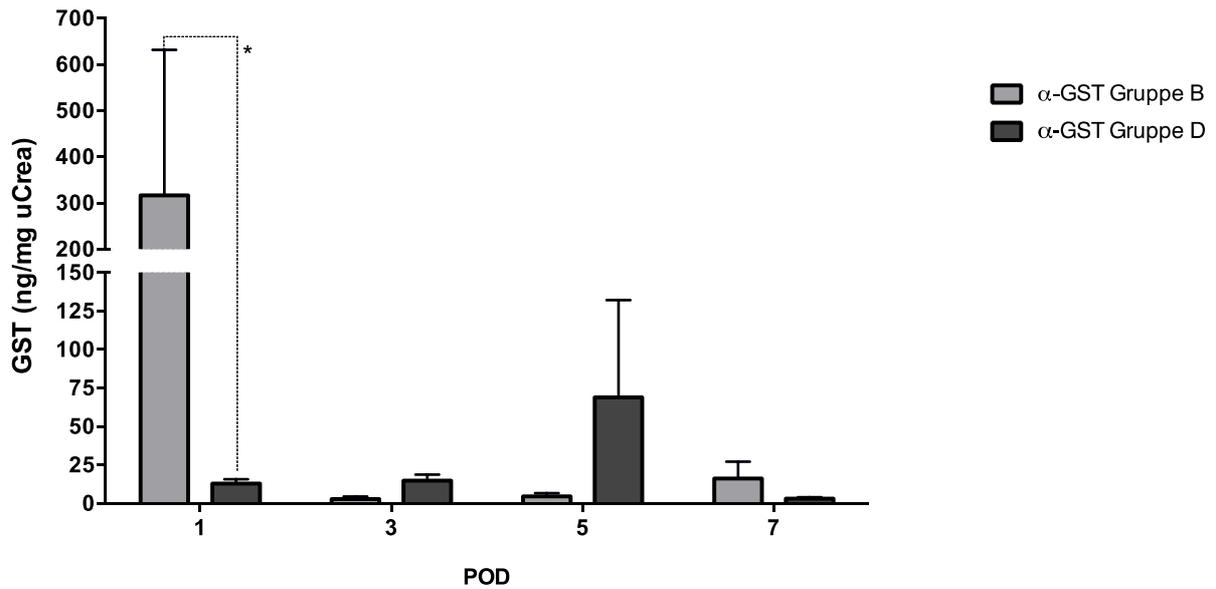


Abbildung 19. Verlauf der  $\alpha$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende-Empfängern (Gruppe D) mit CNI-Toxizität (Subgruppe 2)

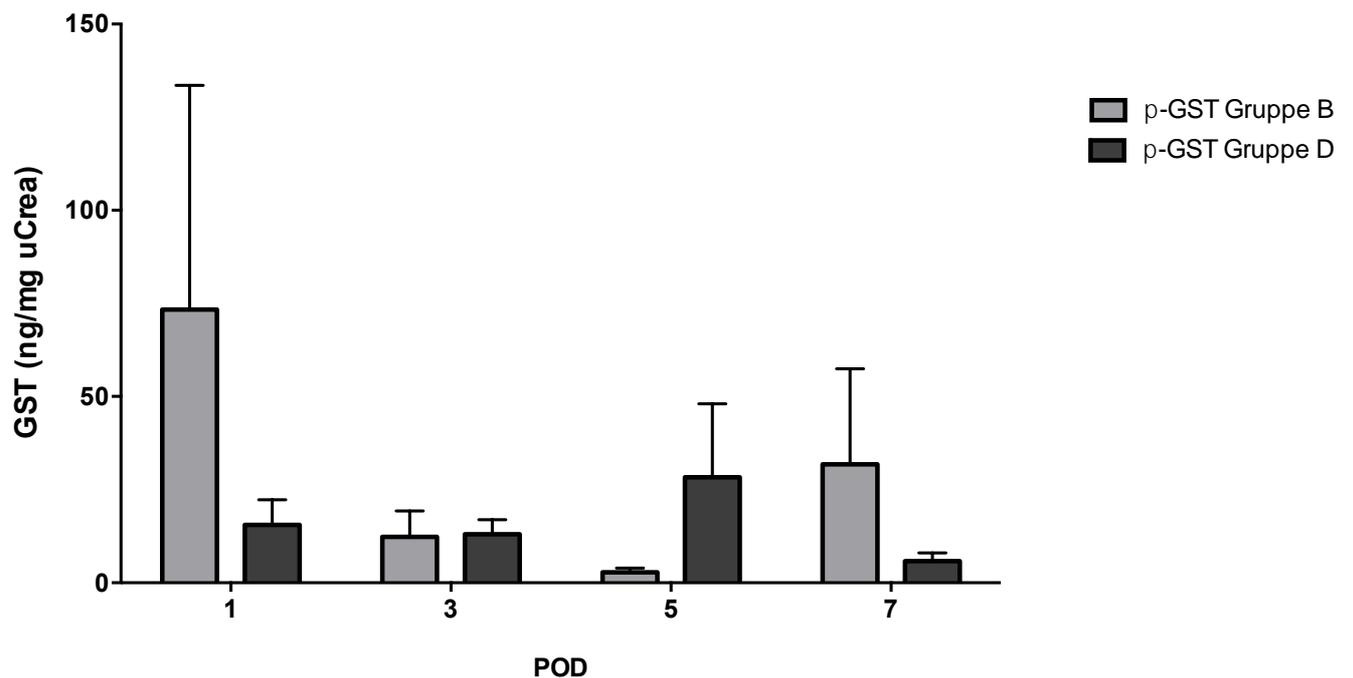


Abbildung 20. Verlauf der  $\pi$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende-Empfängern (Gruppe D) bei CNI-Toxizität (Subgruppe 2)

### 3.4.2.3. Akute Abstoßungsreaktion und Calcineurin-induzierte Nephrotoxizität (Subgruppe 3)

Patienten mit zwei Ereignissen, d.h. sowohl einer histologisch gesicherten akuten Abstoßung als auch überhöhten Immunsuppressivspiegeln, wurden als eine weitere Subgruppe (3) betrachtet. Im Falle des Vorliegens von zwei Ereignissen zeigte  $\alpha$ -GST nach initialem Abfall einen (nicht signifikanten) Wiederanstieg am 3. POD. In den Abbildungen 21 und 22 ist die Kinetik von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in dieser Subgruppe bei Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende- (Gruppe D) Empfängern dargestellt.

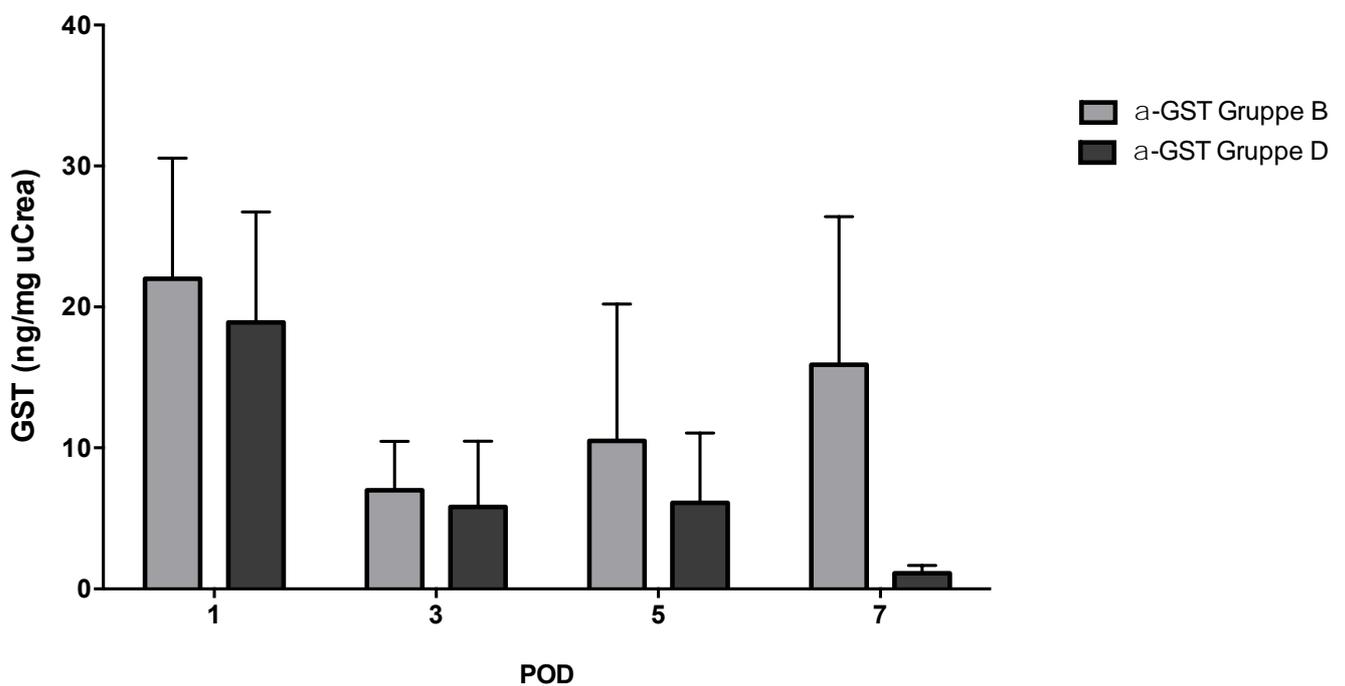


Abbildung 21. Verlauf der  $\alpha$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende-Empfängern (Gruppe D) bei akuter Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe 3)

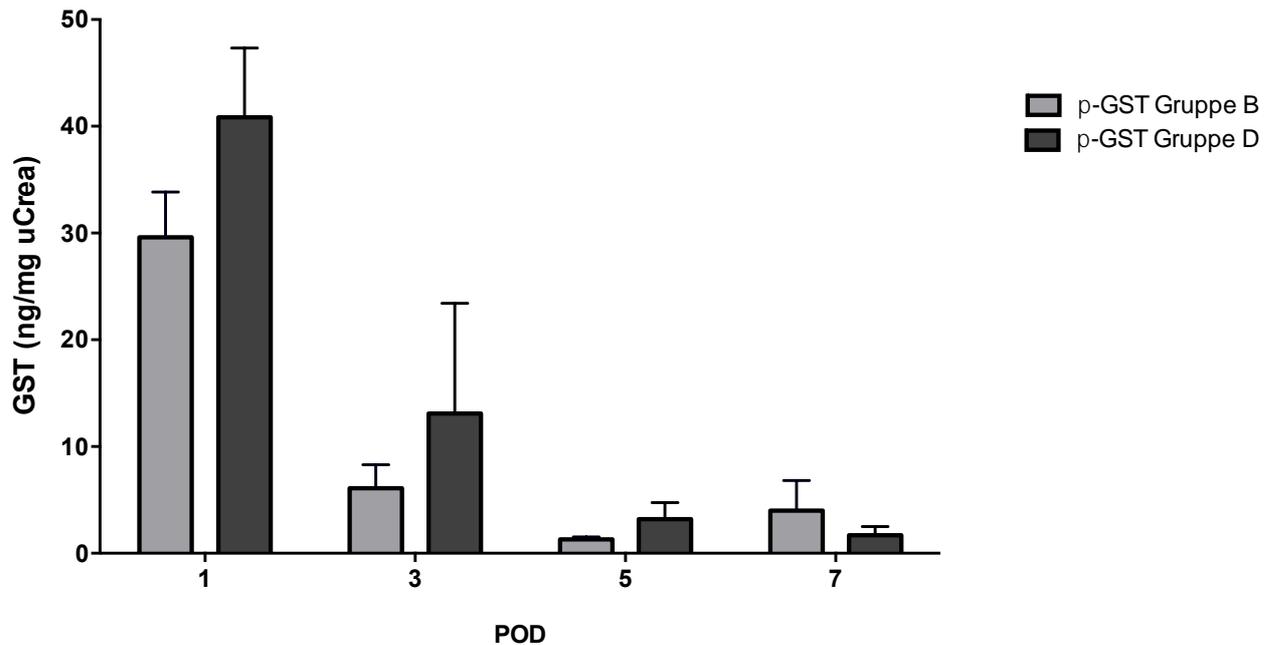


Abbildung 22. Verlauf der  $\pi$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspende-Empfängern (Gruppe D) bei akuter Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe 3)

#### 3.4.2.4. Verzögerte Transplantatfunktion-Delayed-Graft-Function (Subgruppe 4)

Eine verzögerte Transplantatfunktion, charakterisiert durch die Notwendigkeit einer Dialyse (und unter Ausschluss einer CNI-Toxizität und Rejektion) innerhalb der ersten Woche nach Transplantation, zeigte sich ausschließlich in der Gruppe der Leichenspender-Empfänger, weshalb hier ein Vergleich zwischen den beiden Empfängergruppen nicht möglich war.

Bei 44% (n=9) der Probanden dieser Subgruppe musste am Tag 1 nach Transplantation die Dialyse weitergeführt werden. Wie in der Abbildung 23 dargestellt, zeigten sich sowohl für  $\alpha$ - als auch  $\pi$ -GST am 1. POD die höchsten Messwerte im postoperativen Verlauf; die Mittelwerte lagen bei 81,5 für  $\alpha$ - beziehungsweise bei 151,6ng/mg uCrea für  $\pi$ -GST. Am 3. POD fand sich ein deutlicher Abfall, allerdings ohne statistische Signifikanz. Während  $\alpha$ -GST am 7. POD weiter fiel, stiegen die  $\pi$ -GST-Werte gegen Ende wieder etwas an.

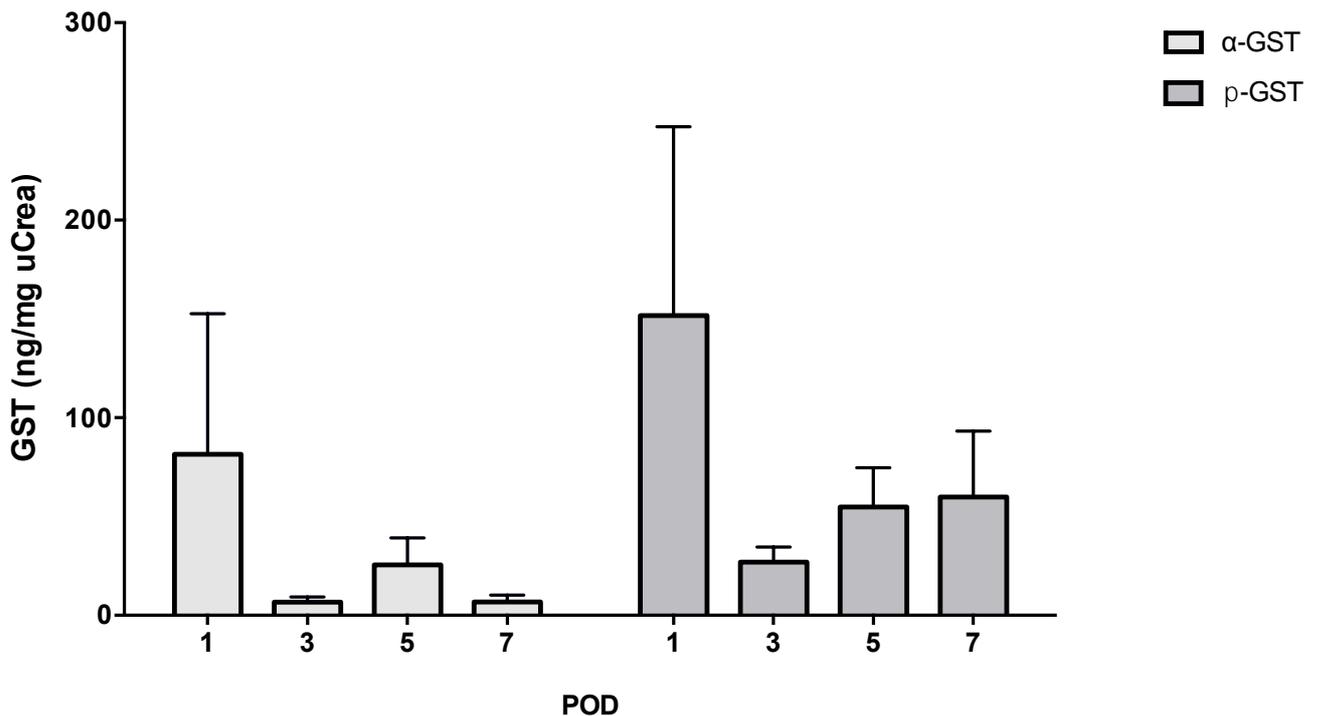


Abbildung 23. Verlauf der  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B) bei DGF (Subgruppe 4)

### 3.4.2.5. Ohne Ereignis (Kontrollen, Subgruppe 5)

In diesem Patientenkollektiv wurde in der ersten postoperativen Woche nach Nierentransplantation keine der oben definierten Ereignisse beobachtet. Die  $\alpha$ -GST Werte zeigten in beiden Empfängergruppen (Leichen- und Lebendspende) eine fallende Tendenz an allen Studientagen, wobei nur der Abfall bei den Lebendspende-Empfängern von  $52,2 \pm 134,4$  ng/mg uCrea (Tag 1) auf  $9,6 \pm 14$  ng/mg uCrea (Tag 7) auch statistisch signifikant war ( $p=0,034$ ). Auffällig war hier auch, dass die Werte bei den Lebendspende-Empfängern an allen Tagen höher lagen als bei den Leichenspende-Empfängern (nicht signifikant,  $p=0,5$ ). Bei den  $\pi$ -GST-Werten der Lebendspende-Empfänger zeigte sich eine ähnliche Kinetik, wohingegen der  $\pi$ -GST Verlauf bei den Leichenspende-Empfängern zunächst bis Tag 5 einen Anstieg zeigte, um dann am Tag 7 signifikant abzufallen ( $p=0,038$ ).

Diese Unterschiede waren weder bei den  $\alpha$ - noch bei den  $\pi$ -GST-Werten beider Gruppen (Leichen- und Lebendspender) statistisch signifikant.

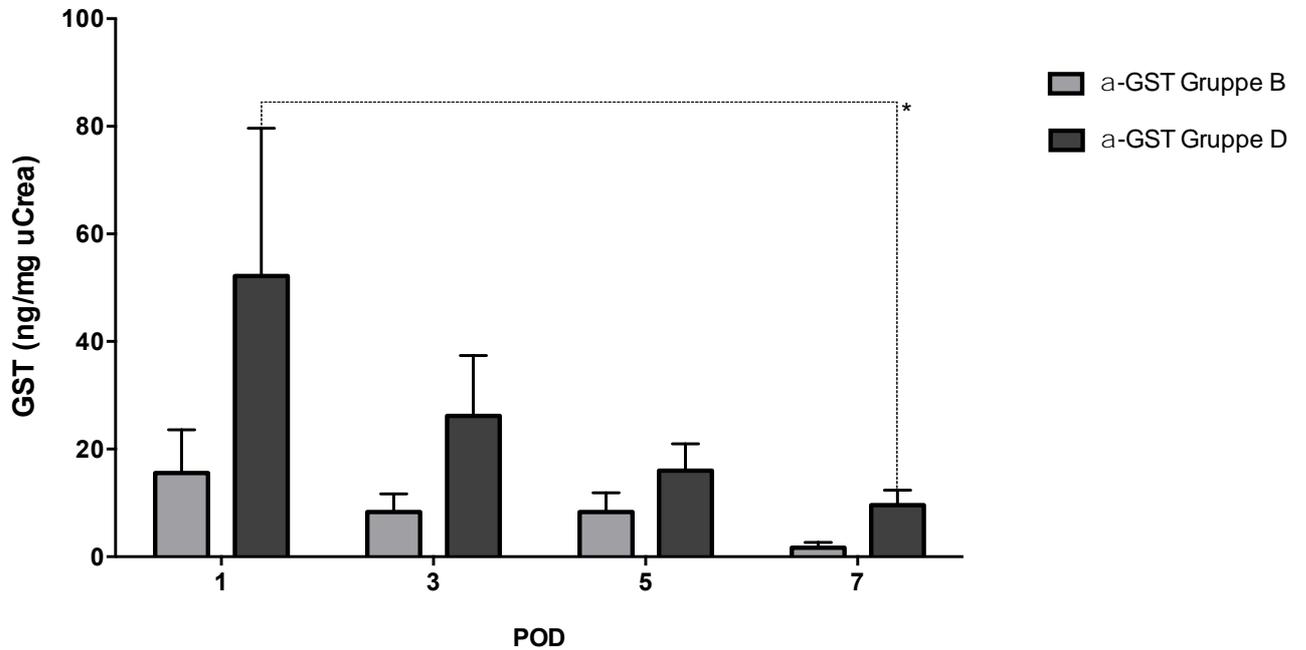


Abbildung 24. Verlauf der  $\alpha$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspender-Empfängern (Gruppe D) ohne Ereignis (Subgruppe 5)

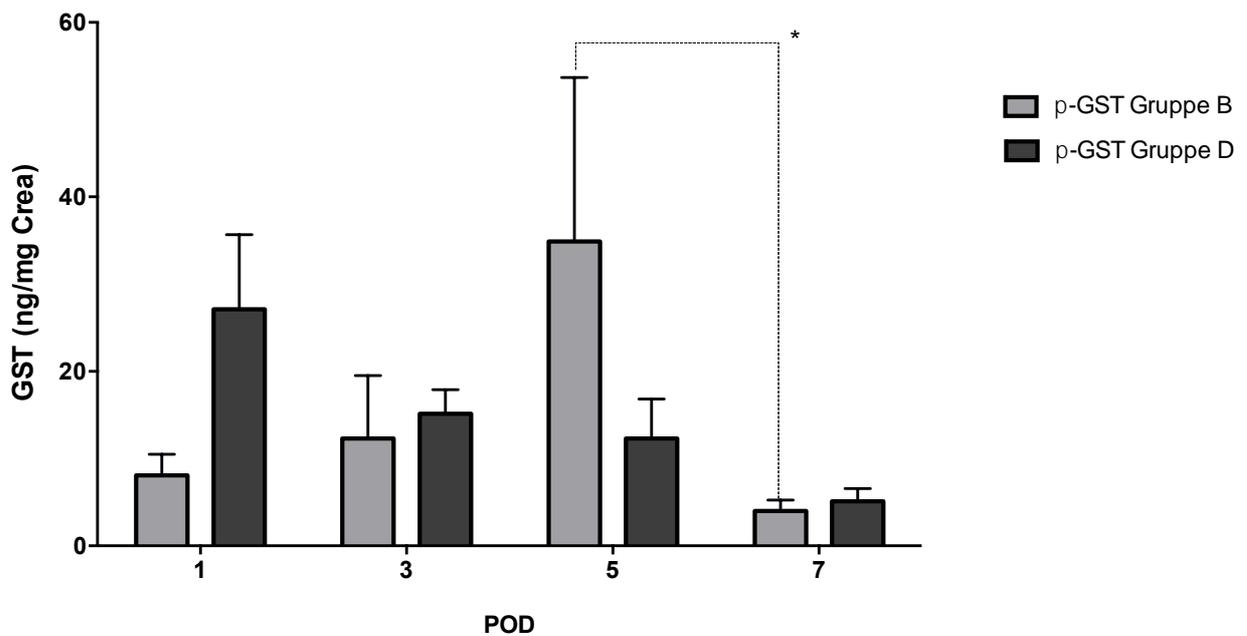


Abbildung 25. Verlauf der  $\pi$ -GST in den Leichen- (Gruppe B) und Lebendspender-Empfängern (Gruppe D) ohne Ereignis (Subgruppe 5)

### 3.4.3. Unterschiede innerhalb der Subgruppen der Leichenspender-Empfänger

Nachdem der Verlauf der GST-Konzentrationen im Urin der Nierentransplantatempfänger im postoperativen Verlauf und die Unterschiede innerhalb der einzelnen Empfängergruppen je nach Ereignis dargestellt wurden, erfolgte auch ein Vergleich der Biomarker bei einem Ereignis innerhalb einer Empfängergruppe gegen die jeweilige Kontrollgruppe (ohne Ereignis im postoperativen Verlauf).

#### 3.4.3.1. Akute Abstoßungsreaktion (G1) versus Kontrollgruppe (G5)

Abbildung 26 und 27 vergleichen die  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Mittelwerte der Leichenspender-Empfänger, die entweder eine akute Abstoßung oder kein Ereignis nach Transplantation hatten. Hier stellten sich beide GST-Isotypen im Falle einer Abstoßung am Tag 1 mit signifikant höheren Werten als in der Kontrollgruppe dar ( $\alpha$ -GST:  $p=0,0094$  ;  $\pi$ -GST:  $p=0,0023$ ). Für  $\alpha$ -GST fand sich ein verzögerter Abfall, während  $\pi$ -GST bereits am 3. POD auf einen Mittelwert von  $22\pm 20,3$  ng/mg uCrea sank.

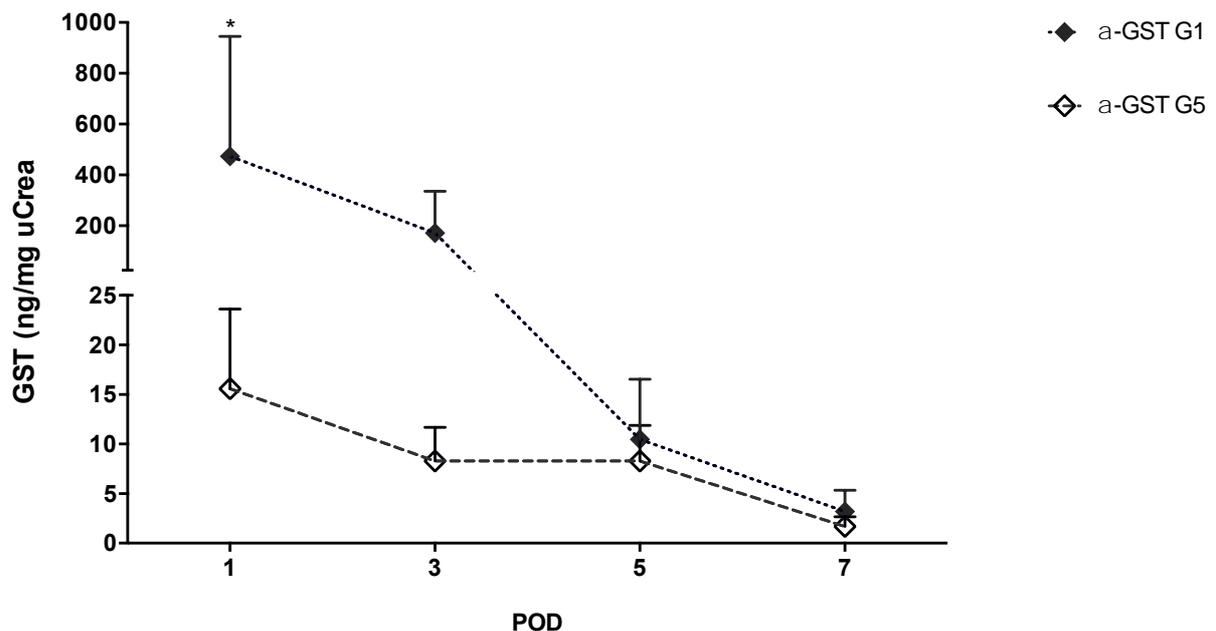


Abbildung 26. Vergleich  $\alpha$ -GST in den Leichenspender-Empfängern (Gruppe B): Akute Abstoßung (Subgruppe G1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

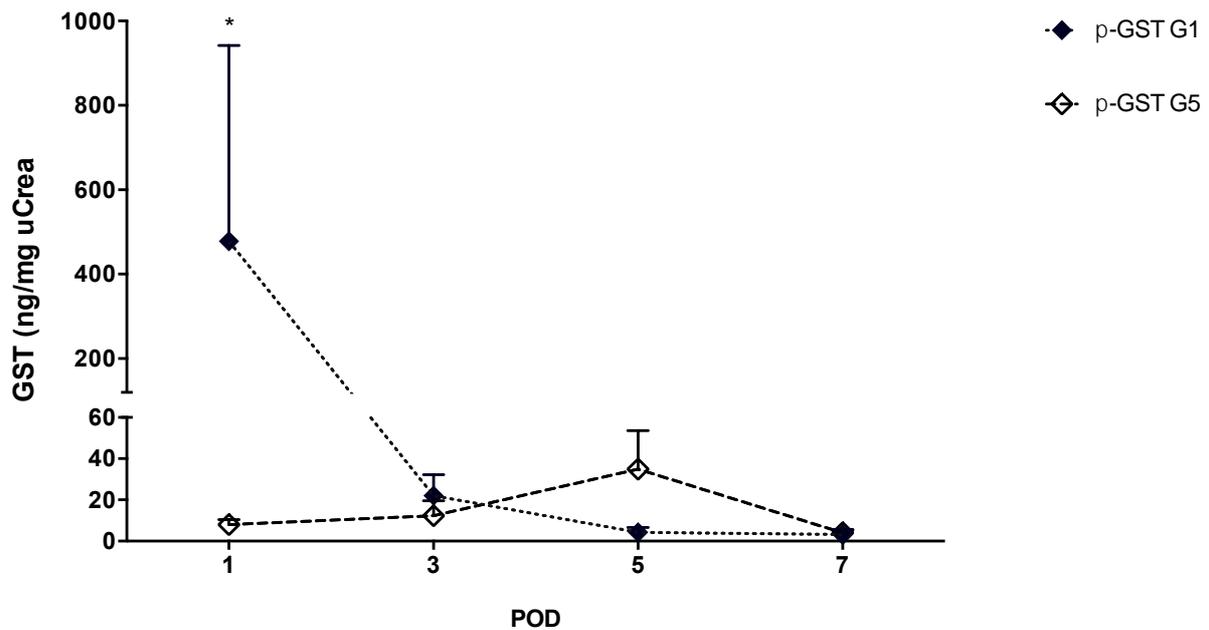


Abbildung 27. Vergleich  $\pi$ -GST in den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): Akute Abstoßung (Subgruppe G1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

Eine ROC Analyse für  $\pi$ -GST am ersten postoperativen Tag zeigte bei einem Cut-off von 21,43ng/mg Crea die Spezifität und Sensitivität des Markers für eine akute Abstoßung bei 66,6% und 100%. Die Survival Kurve für diesen Cut-off Wert ist in der Abbildung 28 dargestellt und zeigt einen signifikanten Unterschied für einen abstoßungsfreien Verlauf oberhalb und unterhalb des cut-off-Wertes. Hingegen ergab die Analyse von  $\alpha$ -GST keinen signifikanten Unterschied.

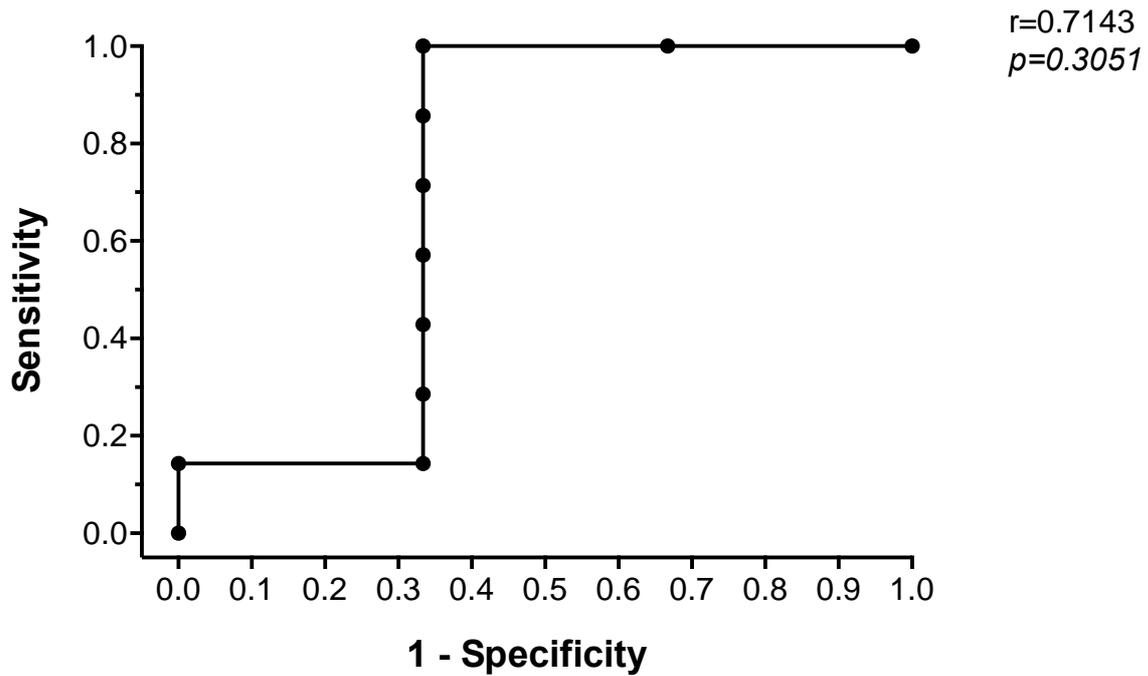


Abbildung 28. ROC Kurve:  $\pi$ -GST bei akuter Abstoßung (Subgruppe 1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe 5, n=9) bei Leichenspende-Empfängern (Gruppe B)

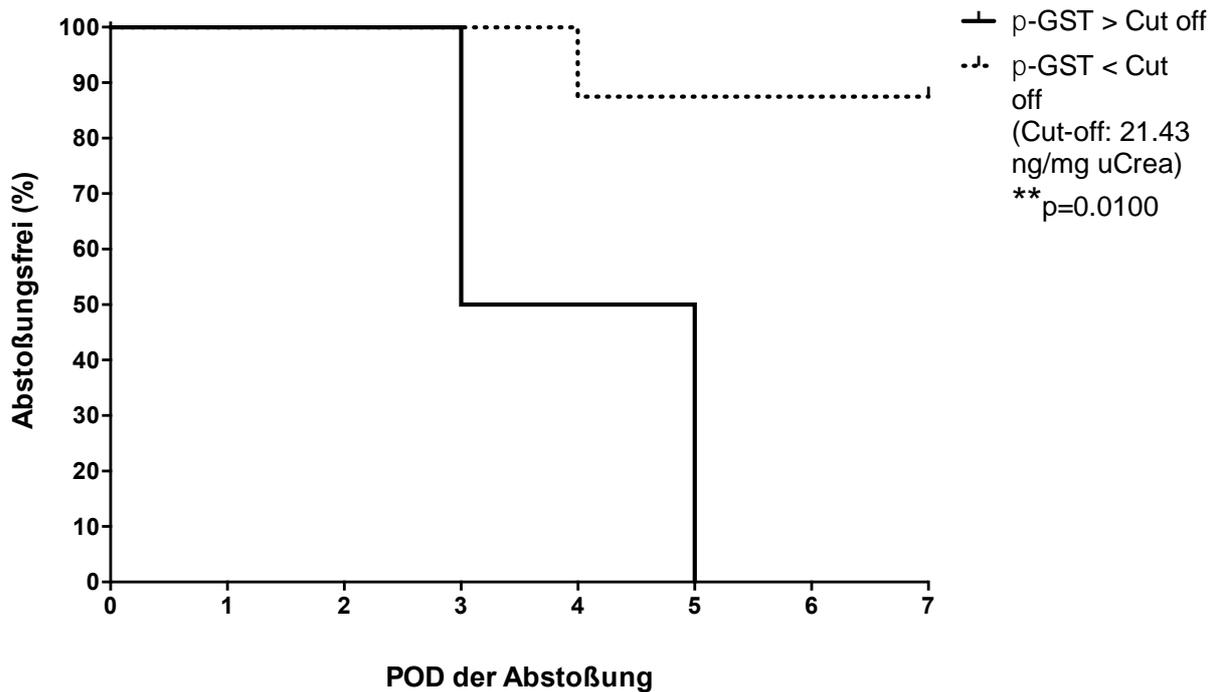


Abbildung 29. Survival Kurve  $\pi$ -GST bei akuter Abstoßung (Subgruppe 1, n=4) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe 5, n=9) bei Leichenspende-Empfängern (Gruppe B)

### 3.4.3.2. CNI-Toxizität (G2) versus Kontrollgruppe (G5)

Die Werte für  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST waren bei einer CNI-induzierten Toxizität am 1. postoperativen Tag im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $\alpha$ -GST:  $p = 0,06$  ;  $\pi$ -GST:  $p = 0,1$ ) erhöht. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich auch 54% der toxischen CNI-Spiegel. Wie Abbildungen 30 und 31 zeigen, fielen beide Marker danach, wobei die Unterschiede über den gesamten Verlauf kein Signifikanzniveau erreichten.

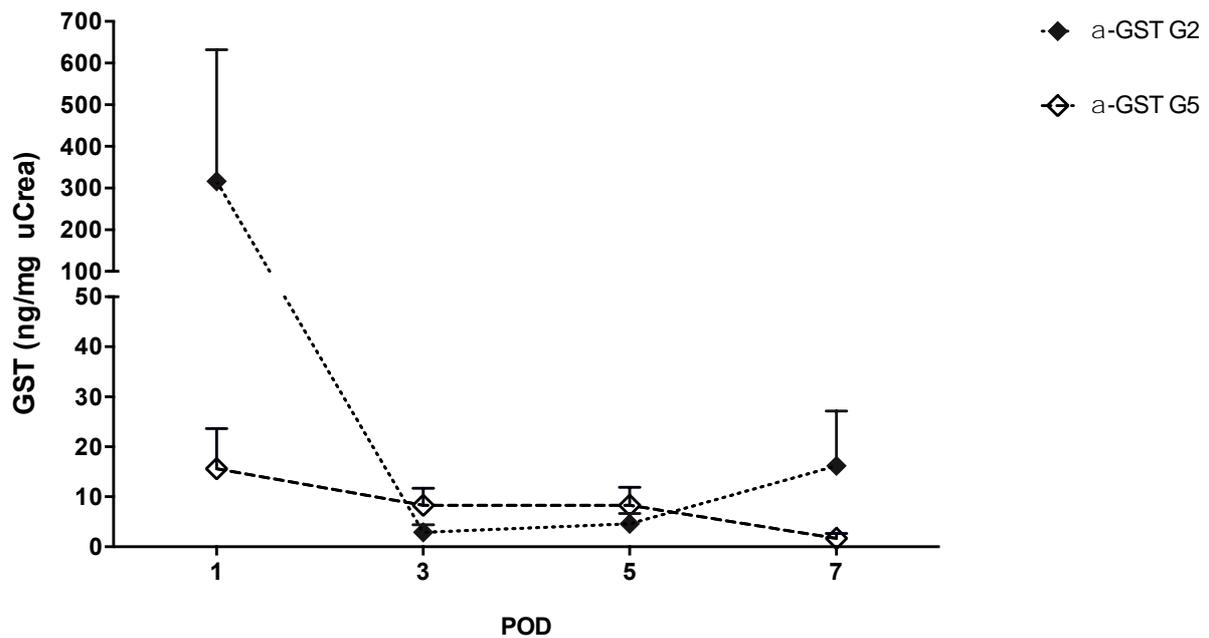


Abbildung 30. Vergleich  $\alpha$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): CNI-Toxizität (Subgruppe G2) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5)

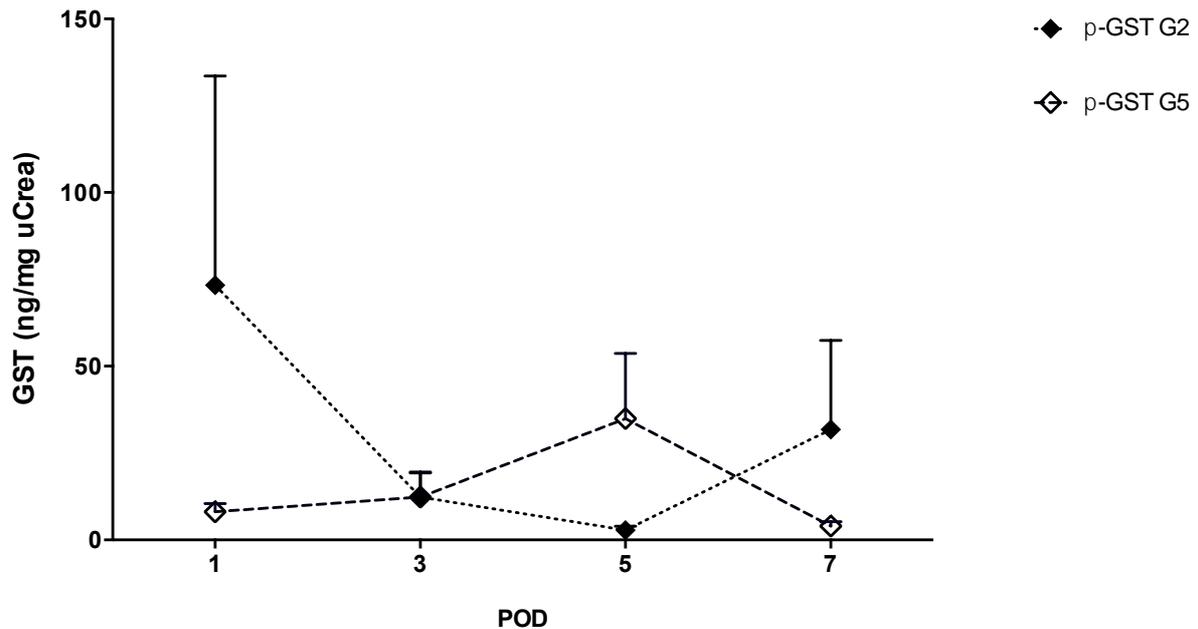


Abbildung 31. Vergleich  $\pi$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): CNI-Toxizität (Subgruppe G2, n=5) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

### 3.4.3.3. Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (G3) versus Kontrollgruppe (G5)

In unserem Patientenkollektiv der Leichenspendenempfänger zeigte sich für  $\alpha$ -GST im Falle einer kombinierten CNI-Toxizität und immunologischen Abstoßung (Subgruppe G3) im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (G5) ein Anstieg nach dem dritten Tag, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Die korrespondierenden  $\pi$ -GST-Werte fielen im Verlauf ab und blieben bis zum Beobachtungsende im niedrigen Bereich ohne sich signifikant von der Kontrollgruppe zu unterscheiden (Abbildung 32 und 33).

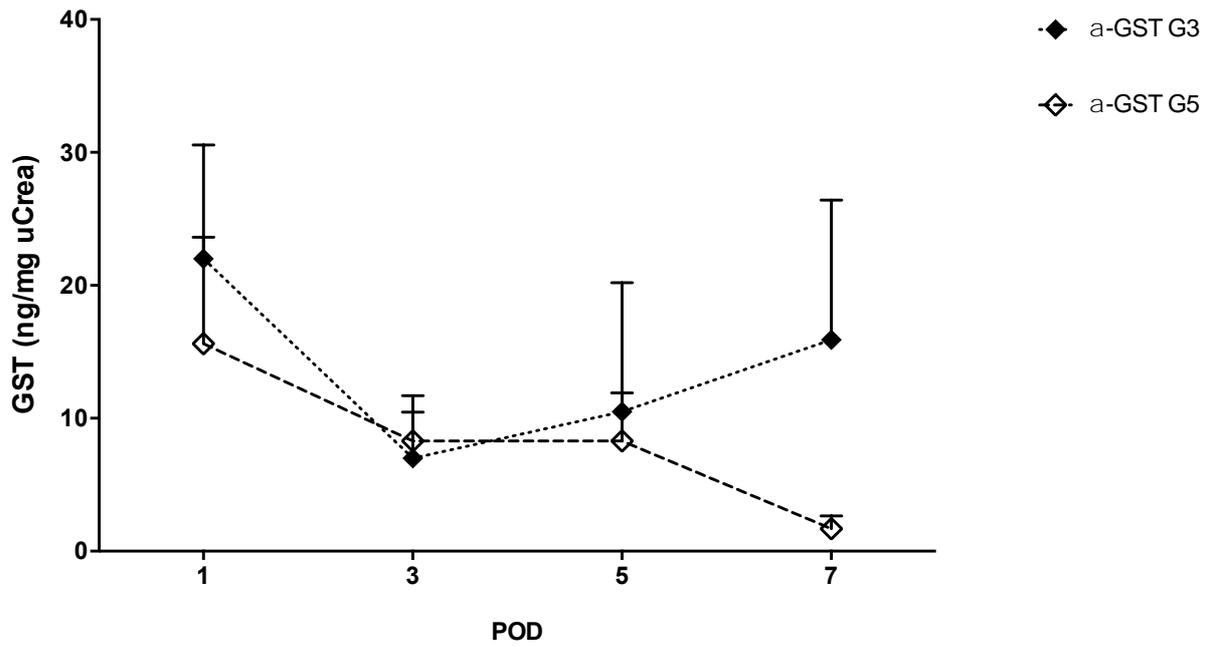


Abbildung 32. Vergleich  $\alpha$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe G3, n=3) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

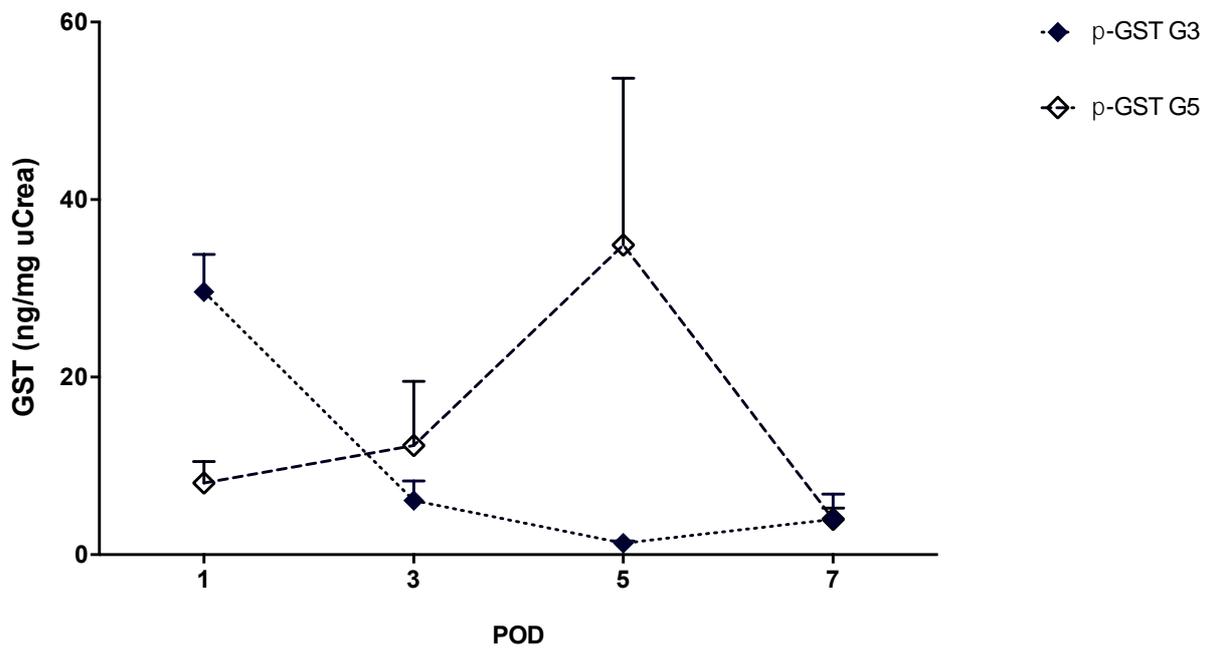


Abbildung 33. Vergleich  $\pi$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe G3, n=3) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

#### 3.4.3.4. Delayed Graft Function (G4) versus Kontrollgruppe (G5)

In Nierentransplantatempfängern mit einer DGF wurden am Tag 1 sowohl hohe  $\alpha$ - als auch hohe  $\pi$ -GST gemessen ( $\alpha$ -GST:  $81,5 \pm 201,3$  ng/mg uCrea,  $\pi$ -GST:  $151,6 \pm 270,6$  ng/mg uCrea). Die  $\pi$ -GST-Werte dieser Gruppe unterschieden sich hierbei signifikant von der Kontrollgruppe ( $p=0,036$ ). Nach einem Abfall der Mittelwerte am 3. POD, stiegen  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST ab Tag 5 wieder an, wobei vor allem die  $\pi$ -GST-Werte im Vergleich mit der Kontrollgruppe bis zum letzten Studientag weiter anstiegen ( $59,8 \pm 94$  ng/mg uCrea vs.  $4 \pm 3,7$  ng/mg uCrea) ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen (Abbildung 34 und 35).

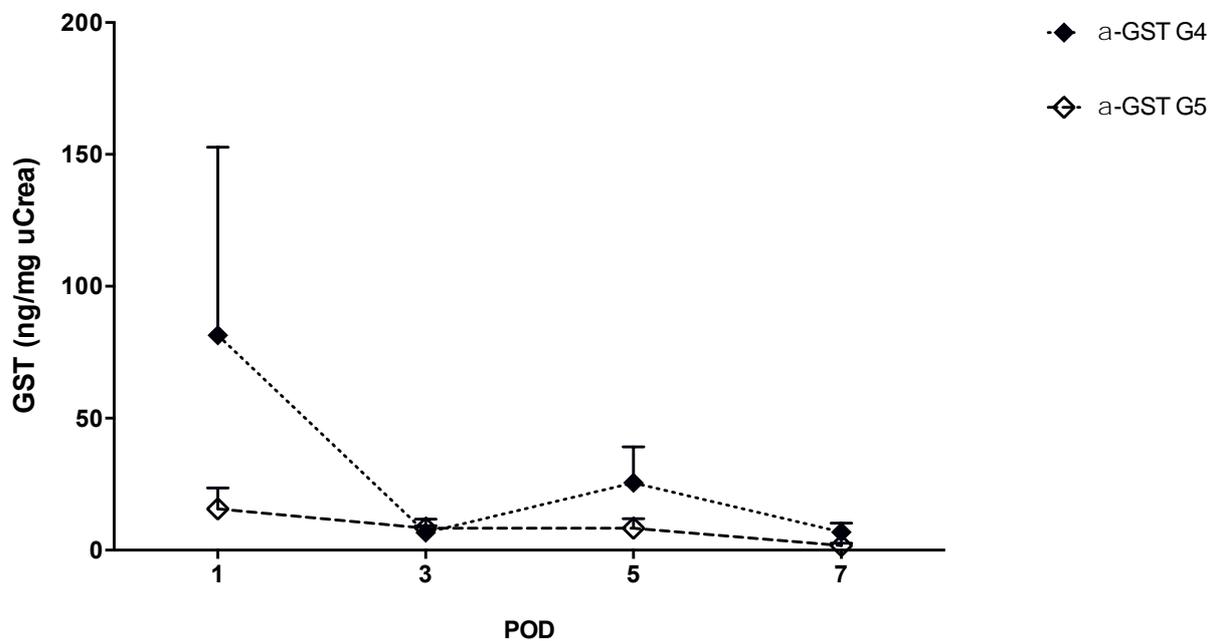


Abbildung 34. Vergleich  $\alpha$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): DGF (Subgruppe G4, n=9) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

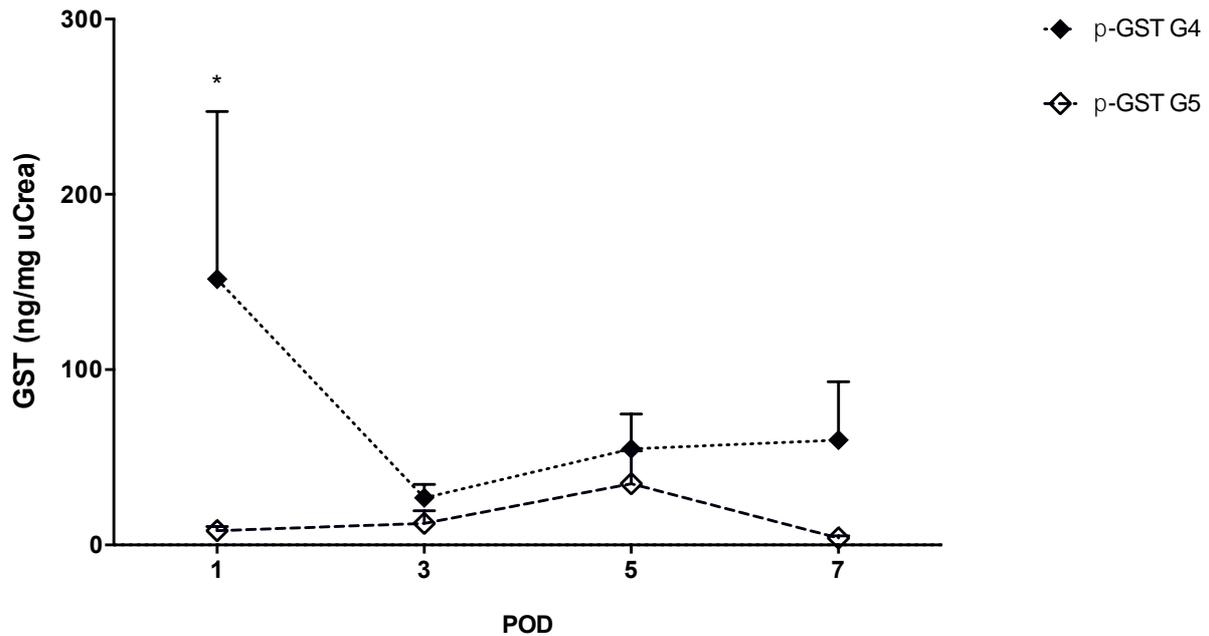


Abbildung 35. Vergleich  $\pi$ -GST bei den Leichenspende-Empfängern (Gruppe B): DGF (Subgruppe G4, n=9) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=9)

In der ROC Analyse zeigte sich für  $\pi$ -GST am ersten postoperativen Tag bei einem Cut-off Wert von 18,3 ng/mg uCrea eine Spezifität von 62,5% und eine Sensitivität von 100% für das Auftreten einer DGF. Hier konnte über die  $\pi$ -GST-Werte am Tag 1 ein Transplantatüberleben ohne die Notwendigkeit einer Dialyse in der ersten postoperativen Woche vorhergesagt werden. Auch am dritten und siebten Tag nach Transplantation scheinen hohe  $\pi$ -GST-Werte im Urin mit einer verzögerten Transplantatfunktion einherzugehen und die Patienten der Subgruppen signifikant auseinanderzuhalten.

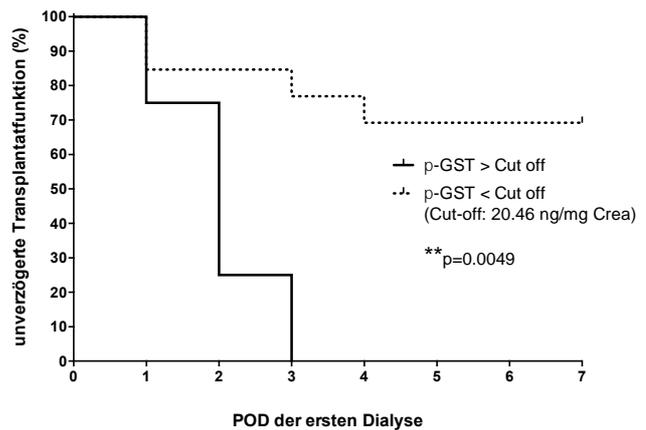
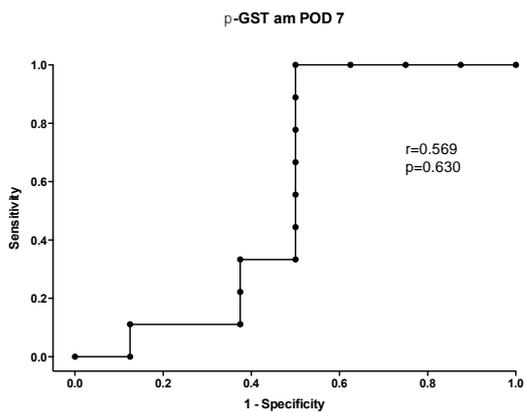
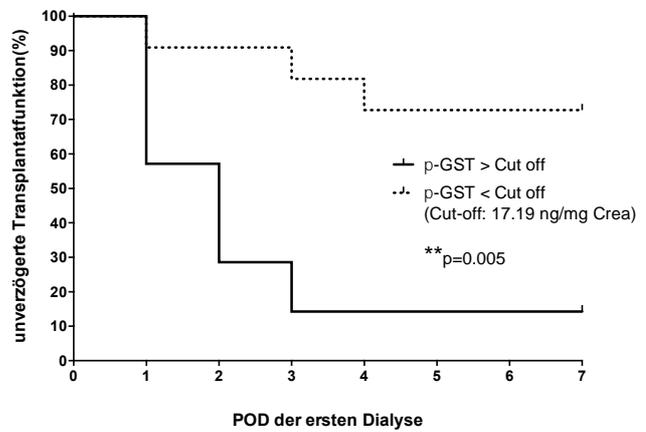
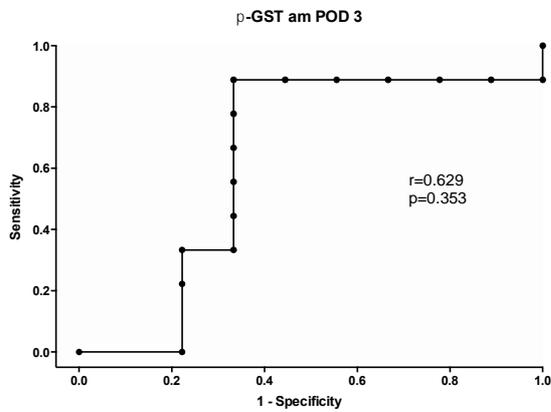
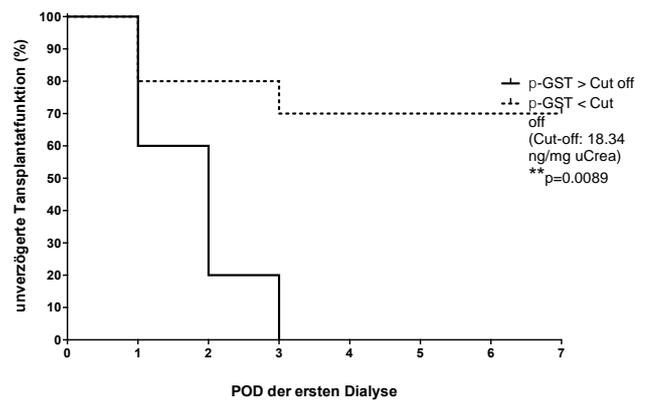
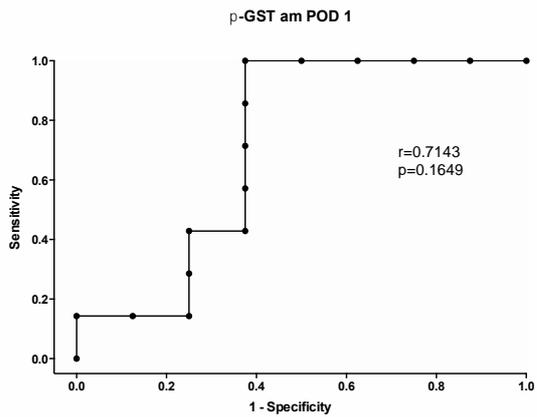


Abbildung 36. ROC- und Survival-Kurven für  $\pi$ -GST bei DGF (Subgruppe 4, n=9) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe 5, n=9) der Leichenspende-Empfänger (Gruppe B) am POD1, 3 und 7

### 3.4.4. Unterschiede innerhalb der Subgruppen der Lebendspender-Empfänger

#### 3.4.4.1. Akute Abstoßungsreaktion (G1) versus Kontrollgruppe (G5)

Die Empfänger einer Lebendspenderniere der Subgruppe 1 präsentierten sich postoperativ mit niedrigeren  $\alpha$ -GST-Werten als ihre Kontrollgruppe, und durch den weiteren Abfall der  $\alpha$ -GST-Werte der Kontrollgruppe im Verlauf näherten sich beide Gruppen bis Tag 7 an, auch ohne davor signifikante Unterschiede zu erreichen. Auch die  $\pi$ -GST-Werte waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe am ersten Tag niedriger und stiegen dann bis Tag 5 an, um dann am 7. POD wieder annähernd auf das Ausgangsniveau abzufallen. Auch hier gab es keine statistisch belegte Signifikanz (Abbildung 37 und 38).

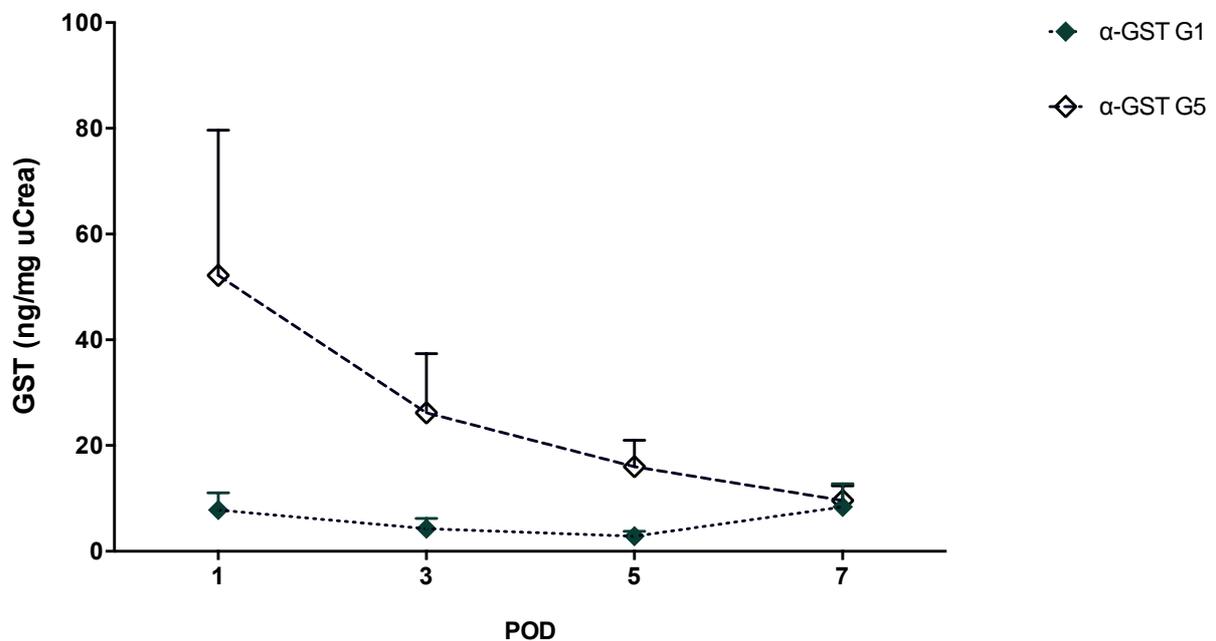


Abbildung 37. Vergleich  $\alpha$ -GST bei den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): Akute Abstoßung (Subgruppe G1, n=8) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

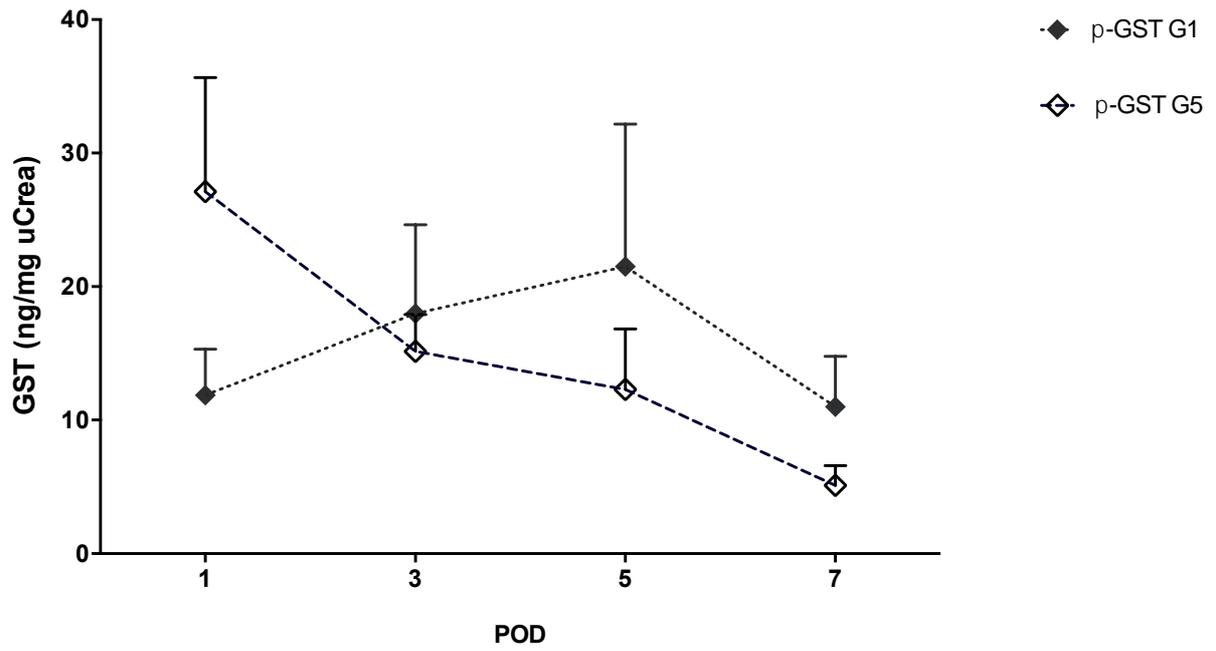


Abbildung 38. Vergleich  $\pi$ -GST bei den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): Akute Abstoßung (Subgruppe G1, n=8) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

### 3.4.4.2. CNI-Toxizität (G2) versus Kontrollgruppe (G5)

Abbildung 39 und 40 vergleichen den Verlauf der beiden GST Isotypen zwischen der Subgruppe G2 und der Kontrollgruppe G5. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\pi$ -GST-Werte zeigten hier an den Tagen 1 und 3 niedrigere Werte als die Kontrollgruppe, wobei beide Marker am Tag 5 anstiegen, jedoch ohne signifikanten Unterschied

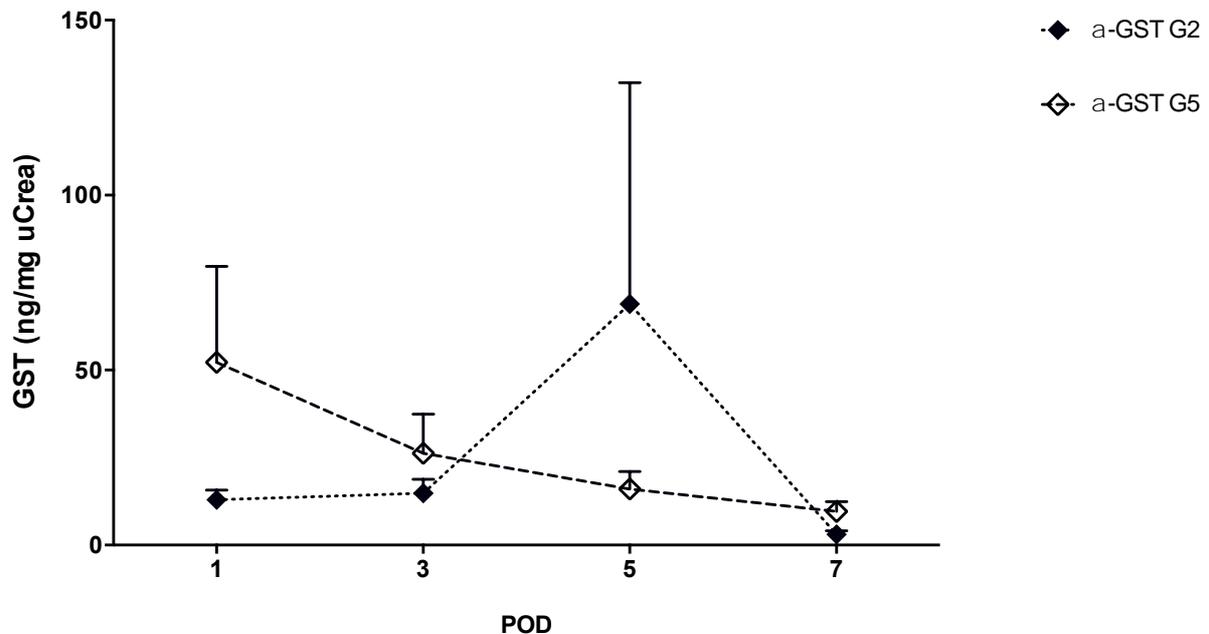


Abbildung 39. Vergleich  $\alpha$ -GST bei den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): CNI-Toxizität (Subgruppe G2, n=12) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

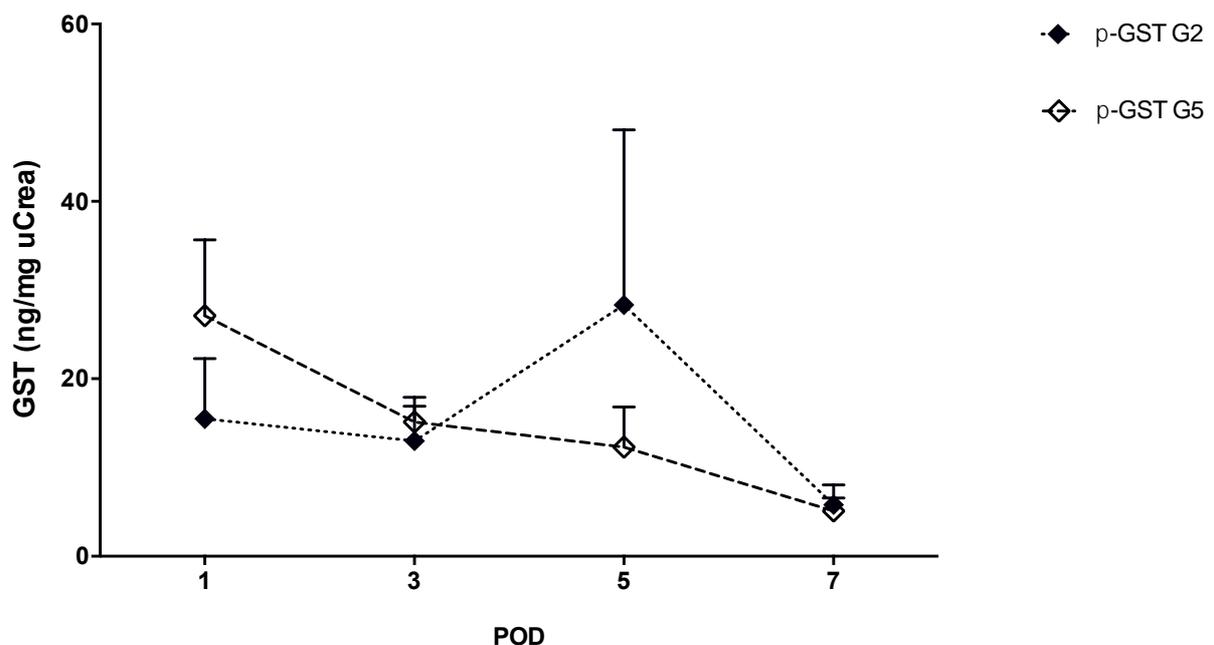


Abbildung 40. Vergleich  $\pi$ -GST bei den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): CNI-Toxizität (Subgruppe G2, n=12) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

### 3.4.4.3. Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (G3) versus Kontrollgruppe (G5)

Die  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte im Urin der Lebendspenderempfänger mit einer kombinierten CNI-Toxizität und immunologischen Abstoßung (Subgruppe 3) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Subgruppe 5). In den Abbildungen 41 und 42 fand sich bei beiden Markern ein stetig fallender Verlauf mit allen Tagen Werten unterhalb der korrespondierenden Kontrollgruppe.

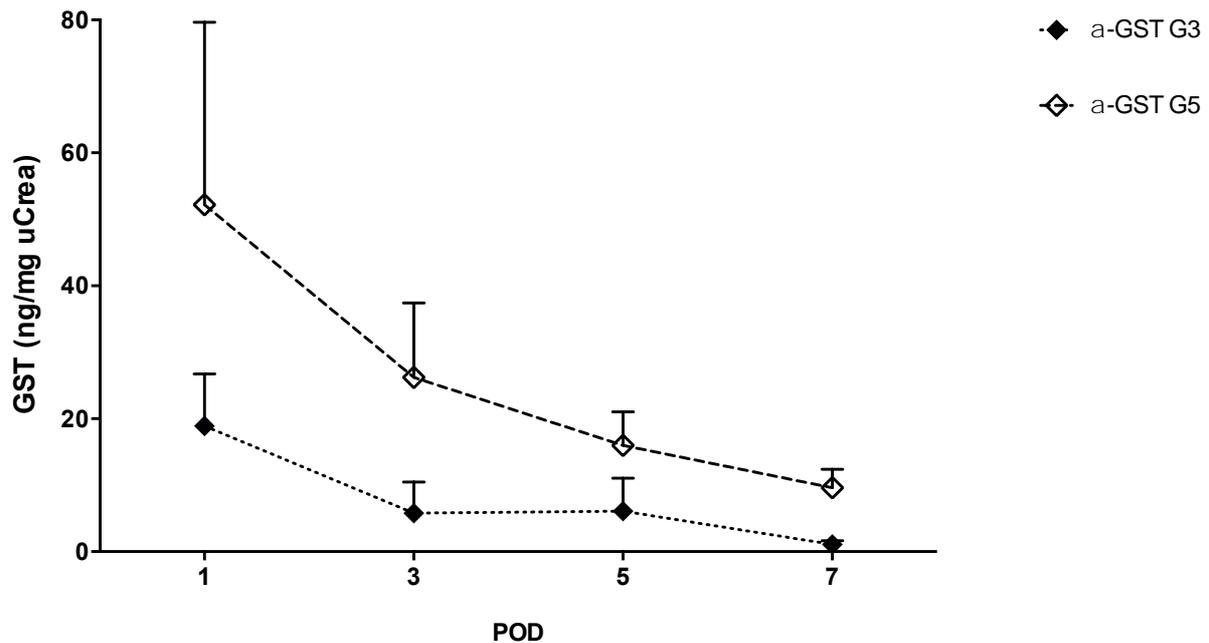


Abbildung 41. Vergleich  $\alpha$ -GST in den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe G3, n=3) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

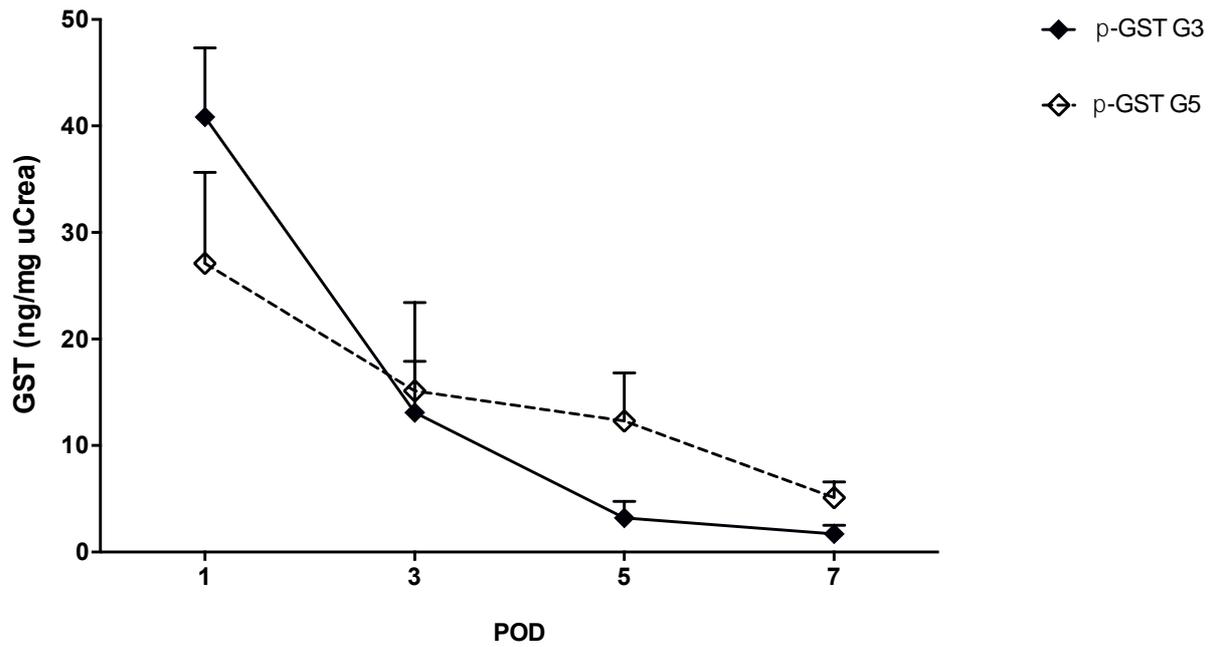


Abbildung 42. Vergleich  $\pi$ -GST in den Lebendspende-Empfängern (Gruppe C): Akute Abstoßung und CNI-Toxizität (Subgruppe G3, n=3) vs. Kontrollgruppe (Subgruppe G5, n=27)

#### 4. Diskussion

Eine Nierentransplantation stellt für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nach wie vor die beste Therapieoption dar, weil sie gegenüber einer langjährigen Dialyse nicht nur die Lebensqualität, sondern auch das Langzeitüberleben der Patienten signifikant verbessern kann. Patienten auf der Warteliste für eine Transplantation leiden nicht nur durch die verlängerte Dialysedauer unter einer psychischen und physischen Belastung, sondern haben, auch im Vergleich zu bereits nierentransplantierten Patienten, eine höhere Mortalität (8). Eine Transplantation ist allerdings auch nicht ohne Risiko. Neben chirurgischen Komplikationen, zeigen sich vor allem in der frühen Phase nach Transplantation nach wie vor häufig akute Abstoßungsreaktionen, die zwar selten zu einem akuten Transplantatverlust führen, aber einen negativen Einflussfaktor für das nach wie vor limitierte Langzeitüberleben transplantierte Nieren darstellen (68, 69). Auch können, bedingt durch den Konservierungsschaden, akute Tubulusnekrosen und eine damit assoziierte verzögert eintretende Organfunktionen (sog. Delayed Graft Function) eintreten (32). Des Weiteren stellt die unerwünschte nephrotoxische Nebenwirkung der allerdings unverzichtbaren Immunsuppressiva ein weitere Bedrohung für die Transplantatfunktion dar (70). Daher, und aufgrund der über die Jahre immer weiter reduzierten Spenderzahlen und dem daraus resultierenden mangelnden Organangebot, werden weitere Strategien gesucht, die nicht nur das Organangebot, sondern vor allem auch das kurz- und langfristige Organüberleben verbessern. Eine solche Strategie wäre unter anderem eine frühere Detektion schädigender Ereignisse, die mit den aktuellen diagnostischen Instrumenten nur unzureichend oder oft zu spät, wenn bereits eine irreversible Organschädigung eingetreten ist, erkannt werden (71).

In den letzten Jahren wurde daher in der Transplantationsforschung intensiv nach effizienteren Parametern gesucht, die eine Nierenschädigung nach Nierentransplantation früher detektieren, aber auch ursachenspezifischere Aussagen ermöglichen, um so auf schädigende Faktoren wie z.B. zu hohe Immunsuppressivaspiegel oder eine medikamenten-assoziierte Nephrotoxizität schneller reagieren zu können (72). Das sog. Bio-Monitoring der Niere fokussiert sich dabei auf den Nachweis spezifischer Proteine in Blut und Urin, welche als Biomarker bei einer Nierenschädigung aus den Nierenzellen freigesetzt werden (73). Der aktuelle

Goldstandard zur Überwachung einer Transplantatfunktion und Diagnosestellung eines akuten Nierenversagens ist aktuell, aufgrund fehlender Alternativen, nach wie vor das Serum-Kreatinin, welches nach den bereits genannten Definitionskriterien zwar auch ein Biomarker wäre, der aber erst spät, bei einer Verminderung der GFR um mindestens 50%, ansteigt und somit erst einen (zu) späten Nachweis einer Nierenschädigung erbringt (37).

Modernere Biomarker zur potentiell früheren und sensitiveren Detektion einer Nierenschädigung wären z.B. die in dieser Studie untersuchten multifunktionellen Enzyme aus der Gruppe der Glutathion-S-Transferasen. Diese Enzyme dienen vor allem der Metabolisierung körpereigener Substanzen wie Leukotriene (74).  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST sind zwei Isoformen der GST, die im Zytosol vorkommen und die sich ihrer Struktur und ihren physiochemischen Eigenschaften unterscheiden.  $\alpha$ -GST befindet sich hauptsächlich im proximalen Abschnitt des Nierentubulus, welcher überwiegend durch Ischämie oder nephrotoxische Wirkstoffe geschädigt wird, wohingegen  $\pi$ -GST eher im distalen Anteil des Tubulus exprimiert wird, und dieser Anteil der Niere ist wiederum histologisch hauptsächlich bei einer akuten Abstoßung der Niere betroffen. Die Konzentrationsmessung beider GST-Isoformen im Urin könnte demzufolge eine spezifischere Aussage über den zugrundeliegenden Mechanismus einer Nierenschädigung zulassen. Entsprechend konnten Bäckman et al. für  $\alpha$ -GST eine höhere Sensitivität und Spezifität für eine proximale tubuläre Nekrose und die damit assoziierte DGF oder medikamenteninduzierte Nephrotoxizität nachweisen (55). Analog fanden sich in anderen Studien bei einer akuten Abstoßung signifikant höhere Konzentrationen von  $\pi$ -GST im Urin (51, 56). Diese Differenzierung konnten wir allerdings anhand unserer Studienergebnisse nicht eindeutig nachvollziehen. So zeigte sich am ersten Tag, im direkten Vergleich mit den Lebendspendenempfängern, bei den Leichenspendenempfängern sowohl bei einer CNI-Toxizität als auch bei einer akuten Abstoßung höhere Enzymspiegel beider Isoformen ( $\alpha$ - und  $\pi$ -GST), und auch im Vergleich zu den Kontrollgruppen innerhalb der Leichenspendenempfänger waren wiederum sowohl  $\alpha$ - als auch  $\pi$ -GST erhöht.

Die Besonderheit unserer Studie lag aber darin, dass wir  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte in unterschiedlichen Gruppen (jeweils Leichen und Lebendspende) einer Nierentransplantation bestimmen konnten, und dabei nicht nur die Empfänger, sondern auch den Urin der Spender (Leichenspender vor Multiorganentnahme, Lebendspender vor einseitiger Nephrektomie) und den prädiktiven Wert sowie die Aussagekraft der

Marker für den weiteren funktionellen Transplantatverlauf untersuchen konnten. Somit konnten wir den Verlauf von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST vor und nach einer Transplantation jeweils in Spendern und Empfängern darstellen. Des Weiteren haben wir in der vorliegenden Arbeit zwischen mehreren Ereignissen, die nach Nierentransplantation einzeln oder gleichzeitig auftreten können, unterschieden.

Die selektive Unterteilung unserer untersuchten Patienten in den Subgruppen erfolgte je nach histologischer Sicherung einer akuten Abstoßungsreaktion oder nach in der Literatur definierten Parametern einer DGF. Die Festlegung einer CNI assoziierten Nephrotoxizität wurde bei Talspiegeln über 15ng/ml für Tacrolimus oder 250ng/ml für Cyclosporin willkürlich und basierend auf eigener Erfahrung sowie die Meinung von Experten definiert. Bisher fehlt in der Literatur die einheitliche Erklärung des geringsten nephrotoxischen Serum-Spiegels für eine Toxizität, und es ist durchaus denkbar, dass die im Serum gemessenen Spiegel nicht mit den Gewebespiegeln korrelieren, sondern je nach individueller P450-Enzymaktivität einer unterschiedlichen Kinetik vorliegt (75).

Andere Studien, wie zum Beispiel die von Min et al. aus dem Jahr 1998, fanden einen toxischen Effekt von Cyclosporin bei Talspiegeln über 204ng/ml (76), was bedeutet, dass die Definitionskriterien und damit Differenzierung der Subgruppen in der vorliegenden Arbeit einen Störfaktor darstellen könnten.

## **$\alpha$ -GST:**

Der Verlauf von  $\alpha$ -GST im Urin zeigte insbesondere bei den Lebendspendern, aber auch in den Kontrollgruppen (Subgruppe G5) beider Empfängergruppen, eine Korrelation mit der Nierenfunktion. So stieg der Marker im Urin nach einseitiger Nephrektomie der Lebendspender an und fiel nach Nierentransplantation vor allem in den Empfängern (sowohl von Lebend- als auch Leichenspende), deren Verlauf ohne Ereignis blieb., wieder ab

Ähnlich dazu konnten Westhuyzen et al. bereits 2003 bei der Analyse von mehreren tubulären Enzymen die prädiktive Wertigkeit von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST für eine akute Nierenschädigung aufzeigen (77). Hierbei war die Aussagekraft der  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte für das Auftreten eines akuten Nierenversagens bei intensivstationärer Behandlung vielversprechender als die Kreatinin-Clearance (AUC 0,893 und 0,929 vs. 0,796).

Als prädiktiver Wert für ein späteres Ereignis des Empfängers war in unserer Studie besonders  $\alpha$ -GST im Urin der Leichenspender interessant. Hier konnten für die Spender, deren spätere Empfänger den Subgruppen - G1 (akute Abstoßung) und G3 (akute Abstoßung UND Rejektion) angehörten, höhere Werte gefunden werden als bei den Spendern, deren spätere Empfänger kein Ereignis (Kontrollgruppe-G5) zeigten. Außerdem zeigte sich bei den Empfängern, deren Spender  $\alpha$ -GST Konzentrationen über 33,97 ng/mg uCrea lagen, eine höheren Inzidenz einer akuten Transplantatabstoßung, so dass hohe  $\alpha$ -GST-Spiegel im Urin von Leichenspendern mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion in den Empfängern assoziiert und dementsprechend negativ prädiktiv sein können.

Es fand sich außerdem, dass sowohl die  $\alpha$ - als die auch  $\pi$ -GST in den Leichenspendern, deren Transplantatnieren später eine schlechte Funktion zeigten und mit einer DGF assoziiert waren, höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe waren. Obwohl diese Werte keine Signifikanz erreichten, gab das Ergebnis ebenfalls einen Hinweis darauf, dass erhöhte GST-Werte im Urin von Leichenspendern mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mit einer DGF einhergehen können und daher bereits vor Multiorganentnahme zu einer besseren Einschätzung der funktionellen Organqualität beitragen könnten.

Entsprechend zeigte sich, dass  $\alpha$ -GST im Urin der Leichenspender, deren Transplantat später im Empfänger ereignislos blieb, die geringsten Konzentrationen von allen

Subgruppen hatten. Dahingegen zeigte das Serum-Kreatinin aller Spender keine wegweisenden Unterschiede hinsichtlich der späteren Subgruppeneinteilung der Empfänger.

Die Quantifizierung von  $\alpha$ -GST in den Empfänger-Subgruppen mit entsprechend definiertem Ereignis, zeigte am ersten postoperativen Tag signifikant höhere Werte in den Leichenspende- im Vergleich zu den Lebendspende-Empfängern. Ursächlich hierfür war am wahrscheinlichsten die längere Ischämiezeit, was Daemen et al. bereits in einer früheren Studie, die allerdings das Perfusat von Transplantatnieren mit Maschinenperfusion untersucht hat, zeigen konnte. Hier korrelierte  $\alpha$ -GST nicht nur mit der Länge der warmen Ischämiezeit, sondern erlaubte auch eine Diskriminierung zwischen funktionierenden und nicht-funktionierenden Transplantaten (78).

In einer Arbeit von Sundberg et al. konnten bei CNI-Toxizität erhöhte  $\alpha$ -GST Werte im Urin von Nierentransplantations-Empfängern gefunden werden (54). Analog dazu zeigten auch unsere Leichenspende-Empfänger mit erhöhten CNI Spiegeln bereits am ersten postoperativen Tag erhöhte  $\alpha$ -GST-Werte, allerdings fanden sich in der analogen Subgruppe 2 der Lebendspende-Empfänger zunächst keine Veränderungen, sondern  $\alpha$ -GST stieg hier erst am 5. postoperativen Tag auf etwa den fünffachen Ausgangswert an. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Leichen- und Lebendspende-Empfängern könnten neben den signifikant differenten Ischämiezeiten, auch darauf zurück zu führen sein, dass die Gruppengröße der Leichenspende-Empfänger in der Subgruppe G2 sehr klein war (n=5) oder auch darin begründet liegen, dass die Lebendspende-Empfänger mit CNI Toxizität in 32% mit Cyclosporin behandelt worden waren, wohingegen alle Leichenspenderempfänger (also auch 100% der Subgruppe 2) Tacrolimus als CNI erhielten. Beide Calcineurin-Inhibitoren sind zwar potentiell nierenschädigend, aber Cyclosporin hat in Lang- und Kurzzeitstudien eine höhere Nephrotoxizitätsrate gezeigt und das hat möglicherweise auch einen anderen Einfluss auf die Kinetik bei der Freisetzung von  $\alpha$ -GST (79, 80).

Eine signifikante Veränderung von  $\alpha$ -GST und damit ein potentieller Nutzen als Biomarker bei Patienten mit sowohl akuter Abstoßungsreaktion als auch CNI-Toxizität (Subgruppe G3) konnte in unserer Arbeit nicht nachgewiesen werden, was allerdings auch durch die geringe Anzahl der Patienten in dieser Subgruppe (n=3) erklärbar wäre.

## **$\pi$ -GST:**

Ähnlich wie für das  $\alpha$ -GST, zeigte sich auch für  $\pi$ -GST in der vorliegenden Studie eine Korrelation mit der Nierenfunktion. Generell fielen die  $\pi$ -GST-Werte im Urin der (Leichen- und Lebendspende) Empfänger nach Transplantation ab. Bei den Lebendspendern kam es unmittelbar nach Nephrektomie zu einem Anstieg der  $\pi$ -GST-Werte, die aber im weiteren Verlauf des einwöchigen Beobachtungszeitraums wieder rückläufig waren.

Analog zu  $\alpha$ -GST war auch bei den der Leichenspendern  $\pi$ -GST nur in den Fällen, deren Organempfänger im Verlauf der ersten Woche nach Transplantation Ereignisse wie eine akute Rejektion oder eine DGF aufwiesen (Subgruppe G1, G3 und G4) erhöht (Abb. 10).

Das zeigt, dass auch höhere  $\pi$ -GST Werte von hirntoten Nierenspendern vor Multiorganentnahme möglicherweise ein späteres schädigendes Ereignis vorhersagen könnten bzw. Nieren von diesen Spendern möglicherweise vulnerabler für immunologische Prozesse sind. Ähnliche Ergebnisse fanden Sárváry et al., die in ihrer Studie zeigen konnten, dass sich alleine über die Höhe des  $\pi$ -GST im Spenderurin die Prognose und die Funktion eines Nierentransplantats vorhersagen ließ (57). Diese Arbeit untersuchte die  $\pi$ -GST-Werte in 61 Leichenspendern und stellte bei einem  $\pi$ -GST cut-off von  $12,55\mu\text{g}/\text{mmol Crea}$  ( $110,94\text{ ng}/\text{mg uCrea}$ ) einen Zusammenhang zwischen niedrigen, beziehungsweise erhöhten  $\pi$ -GST-Werten im Spenderurin und initial verzögerter Transplantatfunktion in den korrelierenden Empfängern her. Einen ähnlichen Zusammenhang konnten Hall et al. herausarbeiten. Sie fanden in den Dialysaten von Transplantatnieren nach Maschinenperfusion signifikant höhere  $\pi$ -GST Werte in den Organen die später eine DGF entwickelten (81). Ähnliche Ergebnisse konnten wir in der vorliegenden Arbeit auch beobachten.  $\pi$ -GST war nicht nur bei den Spendern der Patienten, die später eine verzögerte Organfunktion zeigten am höchsten, sondern auch bei den entsprechenden Empfängern (DGF-Subgruppe 4) bereits am ersten postoperativen Tag signifikant höher als in der korrespondierenden Kontrollgruppe (Abb. 35). Die stärkste prädiktive Aussagekraft zum Transplantatüberleben zeigten die  $\pi$ -GST-Werte am ersten, dritten und siebten Tag nach Transplantation. Erwähnenswert ist hierbei allerdings auch, dass der Abfall der  $\pi$ -GST-Werte am dritten postoperativen Tag und ein Wiederanstieg an den Folgetagen möglicherweise auch dadurch zu erklären ist, dass vier (45%) von neun Patienten dieser Subgruppe in dem Zeitraum dialysiert worden waren.

In unserer Studie zeigt sich weiter, dass  $\pi$ -GST bei einer akuten Abstoßung in Leichenspendenempfängern signifikant erhöht ist. Ähnliche Ergebnisse fanden Polak et al. bereits 1999 (51), in deren Arbeit 58 Empfänger eines Nierentransplantats von Leichenspendern untersucht und in vier Subgruppen unterteilt worden waren: immediate function (initiale Funktion, IF), acute tubular necrosis (akute Tubulusnekrose, ATN) und/oder acute rejection (akute Abstoßungsreaktion, AR). Die Analyse dieser Studie zeigte, dass höhere  $\pi$ -GST Konzentrationen auf eine akute Abstoßungsreaktion hindeuten können. In den Leichenspende-Empfängern unserer Studie war  $\pi$ -GST in der Subgruppe 1 am ersten postoperativen Tag signifikant höher als in der korrespondierenden Kontrollgruppe und die Messung des Markers konnte zu einem frühen postoperativen Zeitpunkt zwischen einer akuten Transplantatabstoßung und einem abstoßungsfreien Verlauf diskriminieren. Auch die  $\pi$ -GST Werte der Lebendspende-Empfänger stiegen im Gegensatz zu der korrespondierenden Kontrollgruppe an, allerdings ohne signifikante Unterschiede.

In unserer Analyse fand sich, dass sowohl  $\alpha$ - als auch  $\pi$ -GST im Urin von Leichenspendern, deren Transplantate in den Empfängern eine akute Abstoßungsreaktion oder DGF zeigten, höhere Werte als bei Spendern deren Empfänger ohne Ereignis blieben, ergaben.

Im Gegensatz hierzu ergab die Messung von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in Lebendspendern keine wesentliche Korrelation zu den korrespondierenden Empfängergruppen mit Funktionsverlusten oder der korrelierenden Kontrollgruppe (Spender, deren Empfänger ohne Ereignis waren).

Bei gleichzeitigem Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion und CNI-Toxizität erlaubten die  $\pi$ -GST-Werte allerdings keine relevante Ableitung des weiteren Verlaufs, wobei in diesen Subgruppen sowohl bei den Leichen- als auch bei den Lebendspende-Empfängern auch nur jeweils drei Patienten waren.

Vor Transplantation (d0) zeigten die Organempfänger (sofern noch eine Diurese vorlag) sowohl höhere  $\pi$ - als  $\alpha$ -GST-Konzentrationen im Urin. Dies konnte sowohl für die Leichen- als auch Lebendspende-Empfänger beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigt eine Studie von Branten et al., die bei Patienten mit chronisch eingeschränkter Nierenfunktion höhere Exkretionen von  $\pi$ -GST als  $\alpha$ -GST nachweisen

konnte (52). Auch bei einem akutem Nierenversagen konnten Seabra et al. in einer Studie mit insgesamt 245 Patienten  $\pi$ -GST als signifikanten Prädiktor einer Dialysenotwendigkeit heraus arbeiten (82).

Obwohl die  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST Konzentrationen bei einem definiertem Ereignis eine Abweichung von den Werten der entsprechenden Kontrollgruppen ergaben, konnte aus unseren Ergebnissen keine Differenzierung zwischen den zugrunde liegenden Ursachen der eingeschränkten Transplantatfunktion abgeleitet werden.

Die Ergebnisse unserer Studie liefern aber Hinweise, dass  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST in Urin nicht nur ein wertvoller und signifikanter Marker für die Nierentransplantatfunktion im postoperativen Verlauf sein können, sondern möglicherweise bereits vor Transplantation durch die Quantifizierung beim Spender einen Stellenwert als prädiktiver Indikator für das Transplantatüberleben haben. Allerdings war sicherlich die, durch die Einteilung in die Subgruppen, geringe Größe des Patientenkollektivs, ein limitierender Faktor dieser Studie. Hinzu kam, dass die GST-Werte in den Subgruppen teilweise große Unterschiede zeigten und sich damit einhergehend große Standardabweichungen ergaben.

Anhand unserer Ergebnisse ist es dennoch gerechtfertigt zu sagen, dass die Planung und Durchführung weiterer Studien mit größeren Patientenkollektiven zur besseren Evaluierung dieses vielversprechenden Biomarkers sinnvoll sind.

## 5. Zusammenfassung

Die frühe postoperative Phase nach Nierentransplantation ist kritisch zu bewerten. Eine Transplantatdysfunktion sollte hierbei rasch identifiziert und adäquat behandelt werden, denn die Transplantation ist die goldwertige Therapieoption der terminalen Niereninsuffizienz und nach wie vor ist das mangelnde Organangebot ein kritisches Problem. Die Glutathion-S-Transferasen sind multifunktionelle Enzyme, die je nach Isotyp in dem proximalen oder distalen Abschnitt des Nierentubulus vorkommen und bei einer Nierenschädigung in den Urin freigesetzt werden. Unsere Studie untersuchte daher die Wertigkeit von zwei Glutathion-S-Transferasen im Spender und Empfängerurin zur Prädiktion und Monitoring einer Nierentransplantatfunktion.

In dieser Studie wurden 30 Nierentransplantate von Leichenspendern und 50 von Lebendspendern untersucht. Sowohl die Spender als auch die Empfänger wurden eingeschlossen und je nach Ereignis (Toxizität, Abstoßung, Delayed Graft Function) nach Transplantation in den Empfängern in Subgruppen unterteilt. Neben den klinischen Routineparametern wurden  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST sowie Kreatinin im Urin und Serum prä- und postoperativ bestimmt.

Beide Isotypen der GST korrelierten zu allen Untersuchungszeitpunkten in den gesunden Lebendspendern nach einseitiger Nephrektomie mit der renalen Funktion.

Hohe  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST-Werte im Urin von Leichenspendern können einen Hinweis auf eine Transplantatdysfunktion in den Empfängern geben und mit einer DGF einhergehen.  $\alpha$ -GST kann bereits vor Transplantation prädiktiv für eine akute Abstoßung oder CNI Toxizität eines Leichenspender-Transplantats sein. Die Bestimmung von GST im Urin von Leichenspendern könnte daher, nach weiterer Evaluierung, zur Risikoabschätzung marginaler Organe herangezogen werden.

Auch nach Transplantation zeigt die Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST im Urin von Leichenspende-Empfängern eine Transplantatdysfunktion an. Ein früher und wegweisender Anstieg des Biomarkers konnte im Falle einer akuten Abstoßungsreaktion sowie einer DGF festgestellt werden. Beide GST-Isoformen eignen sich somit als ergänzende Maßnahme zum Monitoring einer Transplantatfunktion. Eine genaue Differenzierung der Pathogenese (immunologisch, toxisch, ischämisch) der Funktionseinschränkung konnte allerdings in unserer Arbeit anhand der Biomarker nicht erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Arbeit ableiten, dass die Biomarker  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST im Urin zur Prädiktion und Verifikation der Transplantatfunktion vor und nach Leichenspende viel versprechend sind und eine frühzeitige Nierenschädigung vorhersagen können. Wir halten daher die Bestimmung von  $\alpha$ - und  $\pi$ -GST im Urin hirntoter Spender und deren korrespondierender Empfänger für sinnvoll, allerdings sind weitere Studien, die diesen Zusammenhang sowie Grenzwerte und weitere Einflussfaktoren genauer untersuchen, erforderlich.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Harrison JH, Merrill JP Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. Surg Forum 1956;6:432-6
2. Borel JF. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. Wien Klin Wochenschr 2002;114:433-7
3. Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2014. [accessed March 20, 2015, at <http://www.dso.de>].
4. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2014. [accessed March 20, 2015, at <http://www.eurotransplant.org>].
5. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Grill J. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. Am J Transplant 2011;11:2093-109
6. Knoll G. Trends in kidney transplantation over the past decade. Drugs 2008;68 Suppl 1:3-10
7. Smits JMA, Persijn GG, van Houwelingen HC, Claas FHJ, Frei U. Evaluation of the eurotransplant senior program. The results of the first year. American Journal of Transplantation 2002;2:664-670
8. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 1999;341:1725-30
9. Perl J, Hasan O, Bargman JM, Jiang D, Na Y, Grill JS, Jassal SV. Impact of dialysis modality on survival after kidney transplant failure. Clin J Am Soc Nephrol 2011;6:582-90
10. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 2000;47:63-83
11. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans, DB, MacMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. Lancet 1979;2:1033-6
12. Marcen R, Fernandez-Rodriguez A, Rodriguez-Mendiola N, Ponte B, Galeano C, Villafruela JJ, Teruel JL, Burgos FJ, Ortuno J. Evolution of rejection rates and kidney graft survival: a historical analysis. Transplant Proc 2009;41:2357-9

13. Gjertson DW. Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl* 2000;467-80
14. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, Neumayer HH, Glander P. [Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made?]. *Urologe A* 2006;45:9-17
15. Zaza G, Granata S, Tomei P, Dalla Gassa A, Lupo A Personalization of the immunosuppressive treatment in renal transplant recipients: the great challenge in "omics" medicine. *Int J Mol Sci* 2015;16:4281-305
16. Jaber JJ, Feustel PJ, Elbahloul O, Conti AD, Gallichio MH, Conto DJ Early steroid withdrawal therapy in renal transplant recipients: a steroid-free sirolimus and CellCept-based calcineurin inhibitor-minimization protocol. *Clin Transplant* 2007;21:101-9
17. Penn I. Cancers complicating organ transplantation. *N Engl J Med* 1990;323:1767-9
18. Zand MS. Immunosuppression and immune monitoring after renal transplantation. *Semin Dial* 2005;18:511-9
19. Klintmalm G, Sawe J, Ringden O, von Bahr C, Magnusson A. Cyclosporine plasma levels in renal transplant patients. Association with renal toxicity and allograft rejection. *Transplantation* 1985;39:132-7
20. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44:411-22
21. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995;60:225-32
22. Cai JTerasaki PI. Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation* 2010;90:1511-5
23. Willicombe M, Rizzello A, Goodall D, Papalois V, McLean AG, Taube D. Risk factors and outcomes of delayed graft function in renal transplant recipients receiving a steroid sparing immunosuppression protocol. *World J Transplant* 2017;7:34-42

24. Basile DP, Anderson MD Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012;2:1303-53
25. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mirta A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004;114:5-14
26. 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
27. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12
28. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Roco 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
29. Lin CYChen YC. Acute kidney injury classification: AKIN and RIFLE criteria in critical patients. *World J Crit Care Med* 2012;1:40-5
30. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int* 2015;88:851-8
31. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:968-74
32. Siedlecki A, Irish W Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 2011;11:2279-96
33. Troppmann C, Gillingham KJ, Gruessner RW, Dunn DL, Payne WD, Najarian JS, Matas AJ. Delayed graft function in the absence of rejection has no long-term impact. A study of cadaver kidney recipients with good graft function at 1 year after transplantation. *Transplantation* 1996;61:1331-7
34. Shoskes DACecka JM. Effect of delayed graft function on short- and long-term kidney graft survival. *Clin Transpl* 1997;297-303
35. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Panye WD, Dunn DL, Sutherland DE, Gores PF, Gruessner RW, Najarian JS. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993;55:993-5
36. Gjertson DW. Impact of delayed graft function and acute rejection on graft survival. *Transplant Proc* 2002;34:2432

37. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992;38:1933-53
38. Mehta RL, Chertow GM. Acute renal failure definitions and classification: time for change? *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2178-87
39. Shusterman N, Strom BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maislin G. Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure. Clinical epidemiologic study. *Am J Med* 1987;83:65-71
40. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-100
41. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian J Nephrol* 2010;20:2-8
42. Wilczek HE. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation* 1990;50:790-7
43. Redfield RR, McCune KR, Rao A, Sadowski E, Hanson M, Kolterman AJ, Robbins J, Guite K, Mohamed M, Parajuli S, Mandelbrot DA, Astor BC, Djamali A. Nature, timing, and severity of complications from ultrasound-guided percutaneous renal transplant biopsy. *Transpl Int* 2016;29:167-72
44. Parikh N, Vasani RS. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 2007;1:419-36
45. McCann CJ, Glover BM, Menown IB, Moore MJ, McEneny J, Owens CG, Smith B, Sharpe PC, Young IS, Adgey JA. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. *Eur Heart J* 2008;29:2843-50
46. Giffen PS, Pick CR, Price MA, Williams A, York MJ. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity--its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 2002;30:365-72
47. McMahon BA, Koyner JL, Murray PT. Urinary glutathione S-transferases in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review. *Curr Opin Crit Care* 2010;16:550-5

48. Sundberg AGM, Nilsson R, Appelkvist EL, Dallner G. Immunohistochemical Localization of Alpha-Class and Pi-Class Glutathione Transferases in Normal Human Tissues. *Pharmacology & Toxicology* 1993;72:321-331
49. Harrison DJ, Kharbanda R, Cunningham DS, McLellan LI, Hayes JD. Distribution of glutathione S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury. *J Clin Pathol* 1989;42:624-8
50. Sundberg AGM, Appelkvist EL, Backman L, Dallner G. Urinary Pi-Class Glutathione Transferase as an Indicator of Tubular Damage in the Human Kidney. *Nephron* 1994;67:308-316
51. Polak WP, Kosieradzki M, Kwiatkowski A, Danielewicz R, Lisik W, Michalak G, Paczek L, Lao M, Walaszewski J, Rowinski WA. Activity of glutathione S-transferases in the urine of kidney transplant recipients during the first week after transplantation. *Ann Transplant* 1999;4:42-5
52. Branten AJ, Mulder TP, Peters WH, Peters WH, Assmann KJ, Wetzels JF. Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. *Nephron* 2000;85:120-6
53. Gautier JC, Riefke B, Walter J, Kurth P, Mylecraine L, Guilpin V, Barlow N, Gury T, Hoffman D, Ennulat D, Schuster K, Harpur E, Pettit S. Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with Cisplatin. *Toxicol Pathol* 2010;38:943-56
54. Sundberg A, Appelkvist EL, Dallner G, Nilsson R. Glutathione Transferases in the Urine - Sensitive Methods for Detection of Kidney Damage-Induced by Nephrotoxic Agents in Humans. *Environmental Health Perspectives* 1994;102:293-296
55. Backman L, Appelkvist EL, Ringden O, Dallner G. Glutathione transferase in the urine: a marker for post-transplant tubular lesions. *Kidney Int* 1988;33:571-7
56. Kuzniar J, Marchewka Z, Krasnowski R, Boratynska M, Dlugosz A, Klinger M. Enzymuria and low molecular weight protein excretion as the differentiating marker of complications in the early post kidney transplantation period. *Int Urol Nephrol* 2006;38:753-8
57. Sarvary E, Nemes B, Jaray J, Dinya E, Borka P, Varga M, Sulyok B, Rempert A, Toth A, Perner F. Prediction of early renal graft function by the measurement of donor urinary glutathione S-transferases. *Transplantation* 2000;69:1397-402

58. Final Report on the pilot joint EMEA/FDA VXDS experience on qualifications of Nephrotoxicity Biomarkers. 2008, EMEA: London. [accessed May 10, 2015, at [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2009/10/WC500004205.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500004205.pdf)].
59. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002;62:237-44
60. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004;66:1115-22
61. Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008;15:222-34
62. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int* 2008;73:1008-16
63. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3046-52
64. Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol* 2006;21:856-63
65. Kim NH, Oh JH, Seo JA, Lee KW, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kang YS, Han SY, Han KH, Ji YH, Cha DR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;67:167-77
66. Christians U, The Role of Proteomics in the Study of Kidney Diseases and in the Development of Diagnostic Tools. *Biomarkers of Kidney Disease*, ed. C.L. Edelstein. San Diego: Elsevier, 2010: Chapter 4: 101-176
67. Shaw M. Cell-specific biomarkers in renal medicine and research. *Methods Mol Biol* 2010;641:271-302
68. Meier-Kriesche HU, Schold JD Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4:1289-95

69. Lamb KE, Lodhi S Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011;11:450-62
70. Bennett WM, Burdmann E, Andoh T, Elzinga L, Franceschini N Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20:214-20
71. Christians U, Klawitter J, Klawitter J, Brunner N, Schmitz V. Biomarkers of immunosuppressant organ toxicity after transplantation: status, concepts and misconceptions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7:175-200
72. Alachkar N, Rabb H, Jaar BG. Urinary biomarkers in acute kidney transplant dysfunction. *Nephron Clin Pract* 2011;118:c173-81; discussion c181
73. Christians U, Reisdorph N, Klawitter J, Schmitz V. Biomarkers of immunosuppressive drug toxicity. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2005;10:284-294
74. Bach MK, Brashler JR, Morton DR, Jr. Solubilization and characterization of the leukotriene C4 synthetase of rat basophil leukemia cells: a novel, particulate glutathione S-transferase. *Arch Biochem Biophys* 1984;230:455-65
75. Christians U, Schmitz V, Haschke M. Functional interactions between P-glycoprotein and CYP3A in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1:641-54
76. Min DI, Perry PJ, Chen HY, Hunsicker LG. Cyclosporine trough concentrations in predicting allograft rejection and renal toxicity up to 12 months after renal transplantation. *Pharmacotherapy* 1998;18:282-7
77. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:543-51
78. Daemen JW, Oomen AP, Janssen MA, van de Schoot L, van Kreel BK, Heineman E, Kootstra G. Glutathione S-transferase as predictor of functional outcome in transplantation of machine-preserved non-heart-beating donor kidneys. *Transplantation* 1997;63:89-93
79. Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L, Sarmiento AM, Amil M. Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? *Transplant Proc* 2004;36:877-9
80. Groth CG, Backman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, Touraine JL, Claesson K, Campistol JM, Durand D, Wramner L, Brattstrom C, Charpentier B. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar

- efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999;67:1036-42
81. Hall IE, Bhangoo RS, Reese PP, Doshi MD, Weng FL, Hong K, Lin H, Han G, Hasz RD, Goldstein MJ, Schroppel B, Parikh CR. Glutathione S-transferase iso-enzymes in perfusate from pumped kidneys are associated with delayed graft function. *Am J Transplant* 2014;14:886-96
  82. Seabra VF, Perianayagam MC, Tighiouart H, Liangos O, dos Santos OF, Jaber BL. Urinary alpha-GST and pi-GST for prediction of dialysis requirement or in-hospital death in established acute kidney injury. *Biomarkers* 2011;16:709-17

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Shadi Katou, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Pilotstudie zur Wertigkeit von alpha- und pi-GST bei Nierenspender und -empfänger (Leichen- und Lebendspende) als prädiktiver Marker der Transplantatfunktion] 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](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

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

Datum

Unterschrift

## **8. Curriculum Vitae**

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





## **9. Publikationsliste**

### **Publikation 1:**

Shadi Katou, Mathilde Feist, Wiland Raue, Beate Rau, Johann Pratschke, Andreas Brandl, Inguinal lymph node metastasis of a primary, serous papillary carcinoma of the peritoneum one year after CRS and HIPEC – presentation of a rare case, Visceral Medicine (accepted 17.11.2017)

### **Publikation 2:**

Verena Müller, Julia Strauchmann, Shadi Katou, Johann Pratschke and Corinna Langelotz, Influence of weekday of surgery on operative complications. An analysis of 25.000 surgical procedures, Clinical Research and Trials, 2017

### **Publikation 3:**

Georgi Atanasov, Corinna Dietel, Linda Feldbrügge, Christian Benzing, Felix Krenzien, Andreas Brandl, Shadi Katou, Katrin Schierle, Simon C. Robson, Katrin Splith, Haluk Morgül, Anja Reutzel-Selke, Sven Jonas, Andreas Pascher, Marcus Bahra, Johann Pratschke, Moritz Schmelzle, Angiogenic miRNAs, the angiotensin axis and related TIE2- expressing monocytes affect outcomes in cholangiocarcinoma, Oncotarget, 2018

## **10. Danksagung**

Das erste und größte Dank geht an meinem Doktorvater PD Dr. med. Volker Schmitz, der mich seit meinem ersten klinischen Tag als Famulant begleitet und mir sowohl die klinische als auch die experimentelle Chirurgie ans Herz gelegt hat, und mich bei der anspruchsvollen Arbeit immer wieder durch seinen Optimismus und seine konstruktiven Anregungen motiviert hat.

Ich danke Frau Dr. med. Brigitta Globke für die Betreuung und Unterstützung bei der Patientenaufklärung und Probensammlung.

Dr. rer. medic. Anja Reutzel-Selke danke ich für ihre Hilfe, die Statistik zu verstehen und die Daten auszuwerten.

Ich Danke Herrn Prof. Andreas Pascher für die Möglichkeit die Nierenlebendspende in meine Studie einzuschließen.

Herrn Prof. Johann Pratschke und auch Herrn Prof. Peter Neuhaus danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion an ihrer Klinik durchführen zu können.

Ich möchte mich weiter bei allen Kolleginnen und Kollegen im Transplantations-Büro für die nächtlichen Anrufe im Falle einer Organentnahme bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Mutter, einer überragenden Frau, der ich alles zu verdanken habe.