

Aus dem
Charité Centrum 8 für Chirurgische Medizin,
Chirurgischen Klinik
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum

DISSERTATION

**Analyse von Metaboliten in Trockenblut für die nicht-invasive
Diagnose der akuten Organabstoßung nach Lebertransplantation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mayer, Helene

aus Wiesbaden

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	5
2. Tabellenverzeichnis	5
3. Abkürzungsverzeichnis	6
4. Symbolverzeichnis	9
5. Abstrakt	10
5.1. Deutsche Version.....	10
5.2. English Version	10
6. Einleitung und Fragestellung	12
6.1. Lebertransplantation.....	12
6.2. Anatomie der Leber.....	12
6.3. Indikationen für Lebertransplantation.....	14
6.3.1. Leberzirrhose.....	15
6.3.2. Maligne hepatische Tumoren	18
6.3.3. Akutes Leberversagen.....	20
6.3.4. Kontraindikationen.....	21
6.4. Präoperative Evaluationen	21
6.4.1. Organallokation.....	21
6.4.2. Spenderevaluation	22
6.4.3. Chirurgische Transplantationstechniken: Organentnahme.....	23
6.5. Postoperativer Verlauf.....	23
6.5.1. Induktion einer Immunsuppression.....	23
6.5.2. Langzeit-Immunsuppression	24
6.5.3. Frühkomplikationen	25
6.5.4. Transplantatfunktionsstörungen	26
6.5.5. Spätkomplikationen.....	26
6.6. Akute zelluläre Rejektion.....	27
6.6.1. Pathomechanismen der ACR.....	28
6.6.2. Diagnostik der ACR	30
6.6.3. Notwendigkeit alternativer diagnostischer Methoden	31
6.6.4. Metabolomics	32
6.4. Fragestellung	34
7. Material und Methodik	35
7.1. Studiendesign	35

7.2. Rekrutierung und Studienkohorten	35
7.3. Ein- und Ausschlusskriterien.....	36
7.4. Ablauf und Durchführung.....	37
7.5. Technik der Lebertransplantation.....	38
7.6. Methoden der Probenauswertung.....	39
7.7. Statistik.....	42
8. Ergebnisse	44
8.1. Beschreibung des Patientenkollektivs.....	44
8.2. Trockenblutanalyse	47
8.3. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Versuchsgruppe A2	47
8.4. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Kontrollgruppe B	49
8.5. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Kontrollgruppe C	53
8.6. Schlussfolgerungen	61
8.7. Beurteilung der Test-Performance	63
9. Diskussion	65
9.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse	65
9.2. Diskussion der Methodik	65
9.2.1. Assay Bias und Abhilfemaßnahmen	66
9.2.2. Qualitätsbeurteilung Biomarker	67
9.2.3. Diagnostische Güte aus statistischer Sicht.....	67
9.2.4. Einschränkungen aus Sicht des Studiendesigns.....	68
9.2.5. Einschränkungen aus Sicht der Statistik	69
9.3. Diskussion der Ergebnisse	69
9.4. Abschließende Zusammenfassung.....	71
9.5. Ausblick	71
Literaturverzeichnis	73
Anhang.....	79
Eidesstattliche Versicherung.....	131
Lebenslauf	132
Danksagung.....	133

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der funktionellen Anatomie der Leber.....	12
Abbildung 2:	Indikationen für eine Lebertransplantation in Europa	15
Abbildung 3:	Blutentnahme-(BE)-Zeitpunkte der einzelnen Studienkohorten.....	36
Abbildung 4:	Prinzip eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit ESI-Quelle.....	41
Abbildung 5:	Darstellung der zugrundeliegenden Indikationen für LTx in Gruppe A1	45
Abbildung 6:	Darstellung der zugrundeliegenden Indikationen für LTx in Gruppe A2	45
Abbildung 7:	Darstellung der zugrundeliegenden Indikationen für LTx in Gruppe B	45
Abbildung 8:	<i>Box-Plot</i> zur Darstellung der Verteilung von Purin	61
Abbildung 9:	<i>Box-Plot</i> zur Darstellung der Verteilung von N-Undecanoylglycin	62
Abbildung 10:	<i>Box-Plot</i> zur Darstellung der Verteilung von..... (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol.....	63
Abbildung 11:	<i>Receiver-Operating-Characteristic-Kurve</i>	64

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Banff-Kriterien einer akuten zellulären Rejektion.....	31
Tabelle 2:	Demographie und Studienmerkmale der Probanden	44
Tabelle 3:	Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und A2.....	48
Tabelle 4:	Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und A2.....	49
Tabelle 5:	Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe B	50
Tabelle 6:	Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe B.....	52
Tabelle 7:	Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe C	53
Tabelle 8:	Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe C.....	59
Tabelle 9:	Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der ACR-Diagnostik.....	64

3. Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	Arteria, Arteriae
ACR	Akute zelluläre Rejektion
AFL	<i>Alcoholic fatty liver</i> , zu deutsch: Alkoholische Fettleber
AIDS	Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom
ALD	<i>Alcoholic liver disease</i> , zu deutsch: Alkoholische Lebererkrankung
ALV	Akutes Leberversagen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ASH	<i>Alcoholic steatohepatitis</i> , zu deutsch: Alkoholische Steatohepatitis
AUC	<i>Area under the curve</i> , zu deutsch: Fläche unter der ROC-Kurve
BE	Blutentnahme
BMI	<i>Body Mass Index</i> , zu deutsch: Körpermasseindex
BSPW.	Beispielsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIT	<i>Cold ischemia time</i> , zu deutsch: Kalte Ischämiezeit
CT	Computertomographie
CTP	<i>Child-Turcotte-Pugh-Score</i>
CYP	Cytochrom P
DBS	<i>Dried blood sample</i> , zu deutsch: Trockenblutprobe
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETC.	<i>Et cetera</i>
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
GHz	Gigahertz
H₀	Nullhypothese
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> , zu deutsch: Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , zu deutsch: Humane Leukozytenantigene

HMDB	<i>Human metabolome database</i> , Datenbank über Metabolite im menschlichen Körper
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , zu deutsch: Hochleistungsflüssigchromatographie
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
ICG	Indocyaningrün
IL	Interleukin
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IPF	<i>Initial Poor Function</i> , zu deutsch: Primäre Dysfunktion
IQR	<i>Interquartile Range</i> , zu deutsch: Interquartilsabstand
KG	Kilogramm
LC	<i>Liquid chromatography</i> , zu deutsch: Flüssigchromatographie
LDLT	<i>Living Donor Liver Transplant</i> , zu deutsch: Leberlebendspende
LIMAX	<i>Maximum liver function capacity</i> , zu deutsch: Maximale funktionelle Leberkapazität
LTx	Lebertransplantation
M	Männlich
MM	Millimeter
MAP-K	<i>Mitogen-activated Protein-Kinase</i> , zu deutsch: Mitogenaktivierte Proteinkinase
MELD	<i>Model For End Stage Liver Disease</i>
MHC	Major-Histokompatibilitätskomplex
Min	Minute(n)
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MS	Massenspektrometrie
MTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin</i>
N	<i>Number</i> , zu deutsch: Anzahl (der Studienteilnehmer)
NAFL	<i>Non-alcoholic fatty liver</i> , zu deutsch: Nicht-alkoholische Fettleber
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> , zu deutsch: Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa light chain-enhancer</i>
OLT	Orthotope Lebertransplantation
PBC	Primär biliäre Zirrhose

PBQC	<i>Pooled Biological Quality Control</i> , Kontrollprobe
PGNF	<i>Primary Graft Non-Function</i> , zu deutsch: Primäre Nichtfunktion
PH	<i>Potentia hydrogenii</i> , negativ dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen-Konzentration
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphosylase
PPM	<i>Parts per million</i> , zu deutsch: Anzahl der Teile pro eine Million Teile
POCT	<i>Point-of-Care-Test</i> , zu deutsch: Patientennahe Labordiagnostik
Postop.	Postoperativ
Präop.	Präoperativ
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
R	<i>Range</i> , zu deutsch: Spannweite
RAI	<i>Rejection Activity Index</i> , zu deutsch: Rejektionsindex
RNS	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver-Operating-Characteristic</i> , zu deutsch: Operationscharakteristik
RP	<i>Reversed Phase</i> , zu deutsch: Umgekehrte Phase
SD	<i>Standard Deviation</i> , zu deutsch: Standardabweichung
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , zu deutsch: Einzelnukleotid-Polymorphismus
Sog.	So genannte/ so genannter/ so genanntes
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> , zu deutsch: Klinikinterne Standards
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer porto-systemischer Shunt
TOF	<i>Time of flight</i> , zu deutsch: Flugzeitmassenspektrometer
UCSF	<i>University-of-California-San-Francisco</i>
UHPLC	<i>Ultra-High-performance liquid chromatography</i> , zu deutsch: Ultra-Hochleistungsflüssig-chromatographie
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
USA	<i>United States of America</i> , zu deutsch: Vereinigte Staaten von Amerika
V., Vv.	Vena, Venae
VAMS	<i>Volumetric Absorptive Microsampling</i>
Vs.	Versus
W	Weiblich

- WCOG** *World Congress of Gastroenterology*, zu deutsch: Weltkongress der Gastroenterologie
- WIT** *Warm ischemia time*, zu deutsch: Warme Ischämiezeit
- Z. B.** Zum Beispiel

4. Symbolverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
α	Alpha
Δ	Delta
μ	My
σ^2	Standardabweichung
\tilde{x}	Median
%	Prozent
\pm	Plusminuszeichen
<	kleiner als
\leq	kleiner als oder gleich
\geq	größer als oder gleich

5. Abstrakt

5.1. Deutsche Version

Hintergrund: In den ersten Wochen und Monaten nach Lebertransplantation besteht ein deutlich erhöhtes Risiko einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion (*acute cellular rejection*, ACR), die zu einem Funktionsverlust des Transplantates bis hin zum Tode des Patienten führen kann. Trotz zahlreicher Bemühungen im Bereich der klinischen und experimentellen Forschung ist die Diagnostik einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation weiterhin unzureichend. Ziel dieser Arbeit ist es, nicht-invasive Biomarker zu identifizieren und deren Eignung in der Prädiktion und Diagnostik der akuten zellulären Rejektion bei lebertransplantierten Patienten zu prüfen.

Methodik: Zwischen Dezember 2016 und Mai 2018 wurden insgesamt 81 Patienten eingeschlossen und in der Summe 296 Proben gewonnen. An zuvor definierten Zeitpunkten gewonnenes Probenmaterial (Kapillarblut) wurde bis zur Analyse getrocknet und gelagert. Die Probenauswertung erfolgte anhand einer flüssigkeitschromatografischen Trennung mit Ionisations-gekoppelter massenspektrometrischer Detektion.

Ergebnisse: Ein signifikanter Unterschied der Metabolitprofile zwischen Patienten mit histologisch nachgewiesener ACR (n = 13) und den Kontrollprobanden (n = 51) konnte nachgewiesen werden. Insgesamt wurden drei Metabolite, hierunter N-Undecanoylglycin, Purin und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol, als potenzielle Biomarker für eine ACR identifiziert (Welch-Test, $p < 0,05$).

Diskussion: Weitere Forschung, insbesondere in Form von prospektiven Studien, ist nötig, um die Eignung der Metabolite als Biomarker für die Diagnose einer ACR zu prüfen. Durch die Etablierung eines Biomarker-basierten diagnostischen Verfahrens ist eine Verbesserung der Patientenbetreuung, der Transplantatfunktion und des Langzeitüberlebens potenziell umsetzbar.

5.2. English Version

Background: Orthotopic liver transplantation (OLT) is still the only considerable curative treatment for liver failure and, due to a lack of effective organ replacement technologies, it is yet to be replaced. Especially in the early stages after OLT, patients are running a high risk of acute cellular rejection, which bears the risk of graft loss or even death. Despite substantial effort in the field of clinical and experimental research, diagnosis of acute cellular rejection still represents a

major challenge in postoperative patient care. Hence, this study aims at identifying as well as establishing specific biomarkers in dried blood samples for the diagnosis of ACR.

Methods: Samples were collected according to a preset schedule and then left to dry until further analysis. Sample processing was carried out in collaboration with Metabolomic Discoveries (Wissenschaftspark, Golm) by coupling liquid chromatography to mass spectrometry (Electrospray-ionization mass spectrometry). For statistical analysis Welch's t-test (unequal variances t-test) was applied.

Results: A significant difference in metabolic profiles between ACR-patients and the control group was detected. Three metabolites including N-Undecanoylglycine, Purine and (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol were identified as potential biomarkers for ACR.

Discussion: In order to evaluate the eligibility of the detected biomarkers further prospective research has to be conducted. The establishment of a biomarker-based diagnostic system could potentially contribute to an amelioration in postoperative patient care, graft function, long-term survival and thus allow an overall discharge of the health care system.

6. Einleitung und Fragestellung

6.1. Lebertransplantation

Im Jahre 1963 führte der US-amerikanische Chirurg Thomas E. Starzl die weltweit erste Lebertransplantation (LTx) durch, nachdem er über 200 Transplantationsexperimente am Tiermodell erprobt hatte (1, 2). Während seine ersten Transplantationsversuche erfolglos blieben, konnten in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Fortschritte im Bereich der chirurgischen Techniken, der Immunsuppression und des postoperativen Management erzielt und somit das Gesamtergebnis und die postoperative Lebensqualität enorm gesteigert werden (3). Derzeit besteht eine Zehnjahresüberlebensrate von schätzungsweise 70 % (4).

6.2. Anatomie der Leber

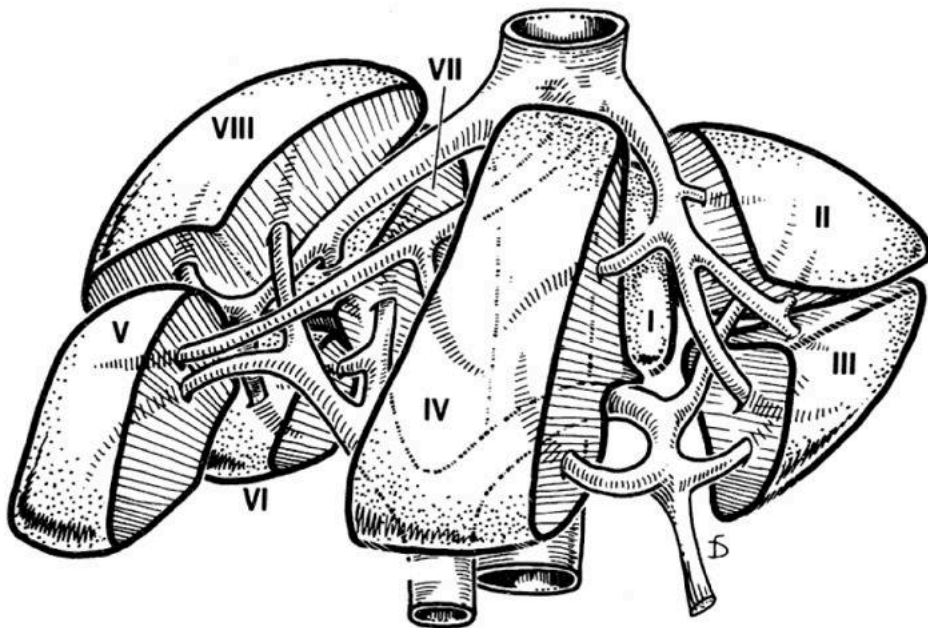


Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Anatomie der Leber, Quelle: (6).

Die Leber befindet sich im rechten oberen Quadranten der Abdominalhöhle und macht mit einem Gewicht von 1,4 bis 1,8 kg als größtes Organ etwa zwei bis drei % (Prozent) des Körpergewichts aus (5). Mit Ausnahme der Area nuda ist die Leber nahezu vollständig von Peritoneum bedeckt und wird über zahlreiche Bänder in ihrer Position fixiert (5). Als parenchymatöses Organ besitzt die Leber eine bindegewebige Kapsel (Glisson-Kapsel, Tunica fibrosa), deren ins Parenchym

einstrahlende Septen die Leberstruktur in vier Lappen gliedern (5). Diese rein topographisch-anatomische Gliederung teilt die Leber in den Lobus hepatis sinister, Lobus hepatis dexter, Lobus caudatus und Lobus quadratus, wobei die Aufteilung in Pars hepatica dextra und sinistra durch das Ligamentum falciforme vermittelt wird (6). Diese Gliederung ist jedoch rein morphologisch und zeigt keine funktionelle Relevanz. Mit seinem Werk „*Le Foie: Études anatomiques et chirurgicales*“ (zu deutsch: "Die Leber: anatomische und chirurgische Studien") beschrieb Claude Couinaud im Jahre 1957 erstmals die funktionelle Gliederung der Leber in acht Lebersegmente und leistete dabei einen bedeutsamen Beitrag zur hepatobiliären Chirurgie (5). Eine schematische Darstellung der Gliederung ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Anders als die anatomische Gliederung der Leber, die an hepatischen Oberflächenstrukturen orientiert ist, beschrieb Couinaud die vaskulären und biliären und somit funktionellen Zusammenhänge (5, 6). Leitstruktur seiner Gliederung ist die „portale Trias“ (Glisson-Trias), bestehend aus Arteria (A.) hepatica propria, Vena (V.) portae hepatis und Ductus hepaticus communis, die in der Leber gemeinsam verlaufen und verzweigen (6). Der Gliederung in Partes dextra und sinistra liegt die Aufzweigung der „portalen Trias“ in zwei Hauptäste zugrunde (6). Durch weitere Aufzweigung der Hauptäste ergeben sich in der Summe acht funktionelle Segmente, die infolge ihrer eigenen Versorgung durch die Trias einzeln oder gemeinsam chirurgisch reseziert werden können.

Histologisch ist die Leber von etwa ein bis 1,5 Millionen Leberläppchen (Lobuli hepatis) durchsetzt, die das zentrale Strukturelement der Leber darstellen. Im Zentrum jedes Lobulus verläuft ein zentrales Blutgefäß, die Vena centralis, weshalb die Lobuli auch als Zentralvenenläppchen bezeichnet werden (7). In ihrer Zusammenkunft bilden mehrere benachbarte Lobuli so genannte Periportalfelder, die ihrerseits Teile der Glisson-Trias, das heißt die Venae, Arteriae und Ductus biliferi interlobulares, beherbergen (7).

Die Lebersinusoiden führen arteriovenöses Mischblut der Venae (Vv.) und Arteriae (Aa.) interlobulares zur Zentralvene und besitzen ein diskontinuierliches Endothel, wodurch der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten erleichtert wird. Dieser findet im so genannten Disse-Raum statt, ein anatomischer Spaltraum zwischen Lebersinusoiden und Hepatozyten. An der perisinusoidalen Oberfläche der Hepatozyten ragen zahlreiche Mikrovilli in den Disse-Raum, sodass der Stoffaustausch durch Oberflächenvergrößerung gewährleistet beziehungsweise begünstigt wird.

Neben den bereits erwähnten Hepatozyten, deren Funktion im Stoffaustausch und der Galleproduktion liegt, finden sich in der Leber außerdem Ito-, Kupffer-, Pit- und Oval-Zellen. Bei den Kupffer-Zellen handelt es sich um spezialisierte, leberspezifische Makrophagen, die dem Endothel der Lebersinusoide anliegen und durch Phagozytose Pathogene und Zellreste aus dem Blut aufnehmen und beseitigen. Die Funktion der Ito-Zellen liegt einerseits in der Speicherung des aus dem Darm resorbierten Vitamin A. Andererseits sind die Ito-Zellen an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt, sodass sie bei der Pathogenese der Leberzirrhose mutmaßlich eine wichtige Rolle einnehmen. Neben den Ito-Zellen liegen im Disse-Raum außerdem die Pit-Zellen, bei denen es sich um leberspezifische natürliche Killerzellen handelt. Die in den Gallengangsepithelien liegenden Oval-Zellen fungieren als hepatische Stammzellen, die der Leber die einzigartige Fähigkeit verleihen, sich selbstständig und umfangreich zu regenerieren. Neben dem arteriovenösen Kreislauf (Vasa privata) verfügt die Leber über den Pfortaderkreislauf (Vasa publica), der eine organübergreifende Funktion besitzt (5, 6). Die Arteria hepatica propria und ihre Gefäßäste sind Teil des Privatkreislaufs und versorgen das Organ mit sauerstoffreichem Blut aus der Arteria hepatica communis beziehungsweise dem Truncus coeliacus (6). Nährstoffreiches Blut der unpaaren Bauchorgane wird von der Vena portae hepatis (Pfortader, Vas publicum) gesammelt und gelangt im Sinne des Pfortaderkreislaufs zur Verstoffwechslung von Nähr- und Giftstoffen in die Leber (6). Zusammen mit dem Ductus hepaticus verzweigen sich Vena portae hepatis und Arteria hepatica propria jeweils in die Arteriae beziehungsweise Venae und Ductus interlobulares. Der venöse Abfluss wird über die Venae centrales gewährleistet, die das Blut über die Venae hepaticae in die Vena cava inferior drainieren. Die von den Hepatozyten gebildete Galle gelangt über ein verzweigtes intrahepatisches Netzwerk zunächst in die Ductus biliferi interlobulares und Ductus hepatici dexter und sinister, die sich zum extrahepatischen Ductus hepaticus communis vereinigen. Etwa die Hälfte der Gallenflüssigkeit gelangt von dort zur Speicherung über den Ductus cysticus in die Gallenblase, der Rest gelangt in den Ductus choledochus, der sich im Verlauf mit dem Ductus pancreaticus vereint und auf der Papilla duodeni major (Papilla Vateri) im Duodenum mündet.

6.3. Indikationen für Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt für eine Vielzahl an Grundleiden, darunter vor allem das akute und chronische Leberversagen, den einzigen kurativen Therapieansatz dar (8).

Gemäß der Angabe des *European Liver Transplant Registry* ist das Endstadium der Leberzirrhose mit einem Anteil von 56,1 % in Europa die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation. An zweiter Stelle (16,5 %) folgen maligne hepatische Tumoren, wobei die Indikationsstellung hierbei fast ausschließlich auf hepatozelluläre Karzinome (HCC) limitiert ist. Hieran reihen sich cholestatische Lebererkrankungen (9,9 %), wie zum Beispiel die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) oder Primär Biliäre Zirrhose (PBC), an (9). Weitaus seltener erfolgt eine Transplantation aufgrund eines akuten Leberversagens (7,6 %). Hierbei handelt es sich überwiegend um akute Hepatitiden und Intoxikationen (9). An letzter Stelle stehen metabolische und andere nicht anderweitig klassifizierte Lebererkrankungen, wie zum Beispiel das Budd-Chiari-Syndrom (0,85 %) (9). Eine Übersicht über die Indikationen zur OLT ist in Abbildung 2 dargestellt.

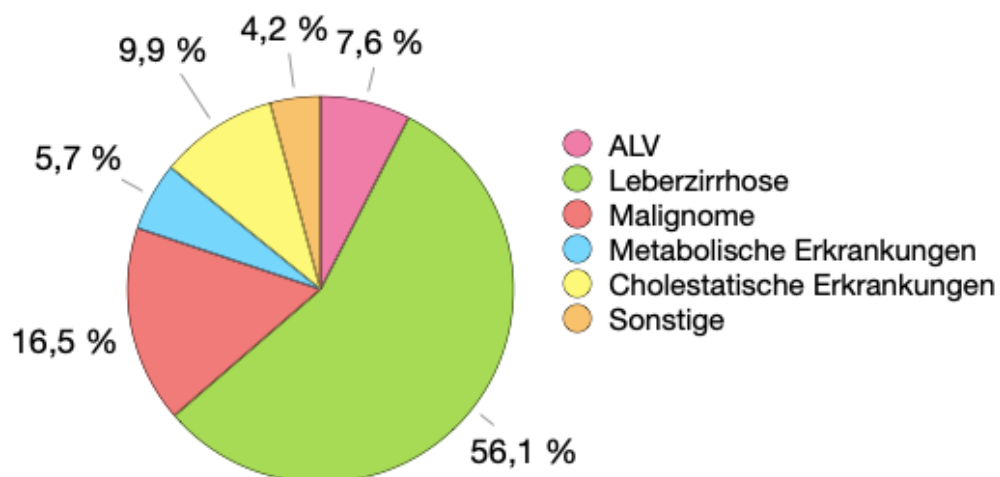


Abbildung 2: Indikationen für eine Lebertransplantation in Europa, Quelle: Daten aus der European Liver Transplant Registry (1988-2015), eigene Abbildung.

6.3.1. Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist das Spätstadium verschiedener chronischer Lebererkrankungen und zeigt sich histologisch als irreversibler nodulärer Parenchymbau mit diffuser Bindegewebsproliferation und Zerstörung der Läppchenstruktur (10). Funktionell resultiert daraus eine Insuffizienz der Synthese- und Entgiftungsfunktion der Leber, sowie die sich daraus ergebenden klinischen Folgeerscheinungen wie beispielsweise eine portale Hypertension (10). Grundsätzlich kann jede Erkrankung der Leber über eine progrediente Fibrose zu einer Zirrhose

führen. Chronische Hepatitiden und nutritiv-toxische Faktoren (Alkoholabusus, metabolisches Syndrom) sind die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Leberzirrhose, wobei nicht selten mehrere der Faktoren synergistisch wirken (10, 11). Prozentual stellt die alkoholische Lebererkrankung (*alcoholic liver disease*, ALD) weltweit die häufigste Ursache einer Leberzirrhose dar, die das Gesundheitssystem aufgrund der steigenden Inzidenzen vor eine wachsende Herausforderung stellt. (11, 12). Unter der ALD werden die alkoholische Fettleber (*alcoholic fatty liver*, AFL), die alkoholische Steatohepatitis (*alcoholic steatohepatitis*, ASH) sowie die alkoholische Leberzirrhose subsummiert, die jeweils unterschiedliche Progressionsstadien mit zunehmender Krankheitsschwere darstellen (12). Aus einer chronischen ASH kann sich, insbesondere bei fortgesetztem Alkoholabusus, sowohl eine Leberfibrose, eine -zirrhose sowie seltener ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln (12).

Während in den vergangenen Jahrzehnten die Leberzirrhose vorwiegend durch chronische Hepatitis-B- und -C-Infektion ausgelöst wurde und dies in Entwicklungsländern überwiegend weiterhin den Status quo abbildet, scheint diese in den Industrienationen zunehmend durch die nutritiv-toxischen Faktoren abgelöst zu werden. Neben der ALD sind außerdem die nicht-alkoholische Fettleber (*non-alcoholic fatty liver*, NAFL), die nicht-alkoholische Steatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) und die nicht-alkoholische Fettleberzirrhose zu nennen, die ebenfalls durch *Lifestyle*-Faktoren ausgelöst werden (11).

Initial bleibt die Leberzirrhose häufig lange asymptomatisch. Erst mit progredienter Verschlechterung der Leberfunktion oder bei akuter Dekompensation wird die Zirrhose mit ihren oft typischen Symptomen klinisch manifest (10). Durch den Ausfall der Leber-Syntheseleistungen werden Betroffene unter anderem durch Koagulopathien, Aszites und rezidivierende hepatische Enzephalopathien symptomatisch (10, 11). Bedingt durch den fibrotischen Parenchymbau kommt es zu einer zunehmenden Querschnittsminderung der Lebersinusoiden und somit zur Erhöhung des Fließwiderstands. Gleichzeitig steigt zirrhosebedingt die Konzentration vasodilatatorischer Mediatoren im Splanchnikusgebiet (13, 10). In der Konsequenz entwickeln etwa die Hälfte aller Patienten mit Leberzirrhose eine portale Hypertension, die in Form entsprechender Umgehungskreisläufe als Ösophagus- und Magenfundusvarizen, Rektalvarizen, periumbilikale Caput medusae, sowie Splenomegalie und Aszites manifest wird (13). Neben den klinischen Symptomen deuten zahlreiche laborchemische Parameter auf eine womöglich bestehende Leberzirrhose hin. Hierbei ist vor allem eine

Einschränkung hepatischer Syntheseparameter, wie eine Reduktion der Albumin-, Cholinesterase- und Quickwerte, relevant. Ein Anstieg hepatischer Entgiftungs- und Cholestaseparameter ist ebenfalls möglich (14).

Klinisch wird die Leberzirrhose häufig anhand des so genannten *Child-Turcotte-Pugh-Score*, der eine Prognoseeinschätzung anhand diverser laborchemischer und klinischer Parameter ermöglicht, eingeteilt (10). Demnach liegt das Einjahresüberleben bei Patienten mit CHILD A-, B- und C-Zirrhose bei jeweils 100, 80 und 45 % (15). Hauptziele in der Behandlung der Leberzirrhose sind, unabhängig von ihrer Ätiologie, zunächst die Elimination möglicher Risikofaktoren und die Behandlung zugrundeliegender Erkrankungen. Weitere Ziele liegen darüber hinaus in der Früherkennung und Behandlung möglicher Komplikationen (10, 16).

Beim Auftreten von Komplikationen wie Aszites, Ikterus, Enzephalopathien und Varizenblutungen spricht man von einer Dekompensation (auch Exazerbation) der Leberzirrhose, welche entsprechende therapeutische Interventionen notwendig macht (13). Um den steigenden Herausforderungen und der Mortalität durch die Dekompensation gerecht zu werden, bietet sich vor allem eine frühzeitige therapeutische, zum Teil auch prophylaktische Intervention an (13). Hierbei stehen Kochsalzrestriktion, ausgewogene, eiweißreiche Ernährung, Aktivimmunisierung gegen Hepatitis A und B sowie regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung von Komplikationen im Vordergrund (13). Eine trotz dieser Maßnahmen persistierende Aszites - eine sogenannte refraktäre Aszites - erfordert darüber hinaus gehende Maßnahmen, wie zum Beispiel wiederholte Parazentese oder die Einlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS). Ebenfalls sollte eine zeitnahe Transplantation erwogen werden (13).

Eine weitere Komplikation der Leberzirrhose im Dekompensationsstadium stellt die hepatische Enzephalopathie dar, die Folge der insuffizienten hepatischen Entgiftungsleistung ist und im Wesentlichen durch die Akkumulation von Ammoniak ausgelöst wird (17). Hyperammonämie führt zu Astrozytenschwellung mit zytotoxischem Hirnödem und in der Konsequenz zum Anstieg des Hirndrucks. Nichtresorbierbare Disaccharide, darunter vor allem Lactulose, verkürzen zum einen die gastrointestinale Transitzeit und verhindern somit die intestinale Aufnahme von Ammoniak. Andererseits erhöhen sie den intraluminalen pH-Wert des Darms, was zu einer Hemmung der bakteriellen Urease und in der Konsequenz zur einer verminderten Ammoniakbildung führt. Daher wird Lactulose nicht nur zur Therapie, sondern auch zur

Sekundärprophylaxe einer hepatischen Enzephalopathie eingesetzt. Zur Beschleunigung des Harnstoffzyklus ist außerdem die Gabe von L-Ornithin-L-Aspartat möglich.

Zwar bieten für die Mehrzahl der Komplikationen Akutmaßnahmen Abhilfe, allerdings stehen effektive Organersatzverfahren für die Leber bislang nicht zur Verfügung. Daher stellt die Lebertransplantation für alle Formen der fortgeschrittenen und/oder dekompensierten Leberzirrhose die einzig kausale Therapie dar. Aufgrund der geringen Spendebereitschaft und langen Wartezeiten sollten entsprechende Vorbereitungen bereits ab einem Stadium B des *Child-Turcotte-Pugh-Score* getroffen werden (18).

6.3.2. Maligne hepatische Tumoren

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt das häufigste primär hepatische Malignom und die weltweit zweithäufigste zum Tode führende Tumorentität dar (19, 20). Ein Anstieg der Inzidenz um 80 % in den vergangenen 20 bis 30 Jahren in den USA legt eine zunehmende gesundheitspolitische Relevanz nahe (20, 21). Mit einer mittleren Lebenserwartung von sechs bis 20 Monaten und einer Mortalität-zu-Inzidenz-Ratio von fast eins ist das *Outcome* trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie im Allgemeinen schlecht (21). Karzinogenetisch liegt dem HCC in über 80 % eine Leberzirrhose zu Grunde (19). Bezüglich der Hauptrisikofaktoren bestehen geographische Differenzen. Während in Asien und Afrika die Hepatitis-B-Infektion im Vordergrund steht, sind es in westlichen Nationen Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) und die alkoholische Fettlebererkrankung (19). Klinisch bleibt das HCC meist inapparent, teilweise treten unspezifische Zeichen wie Schmerzen im rechten Oberbauch oder ungewollter Gewichtsverlust auf (20). Aufgrund dessen werden hepatozelluläre Karzinome daher in 85 % der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Je nach Tumorgröße und -stadium stehen beim hepatozellulären Karzinom kurative und palliative Therapieansätze zur Verfügung (22). Die Resektion stellt bei zirrrosefreien Organen, technisch resezierbaren und nicht vaskulär invadierenden Tumoren das Mittel der ersten Wahl dar (20, 22). Bei guter Funktion der Restleber werden selbst großzügige Resektionen häufig gut toleriert (21, 23). Aber auch bei CHILD-A-Zirrhose sollte eine Resektion erwogen und die Umsetzbarkeit überprüft werden (20). Aufgrund der Gefahr des postoperativen Leberversagens sollte präoperativ neben den Staginguntersuchungen eine Evaluation der funktionellen Leberreserve erfolgen. Ziel der präoperativen Diagnostik ist es, Leber volumina und -funktion zu bestimmen, um gefährdete

Patienten zu identifizieren und das therapeutische Prozedere risikoadaptiert zu individualisieren. Hierfür eignet sich beispielsweise die Indocyaningrün-*Clearance* (23). Die *Clearance* des Farbstoffs Indocyaningrün (ICG), der ausschließlich hepatisch eliminiert wird, spiegelt den hepatischen Blutfluss wider und ist somit in der Lage, bereits geringe Funktionseinbußen der Leber als Abnahme der ICG-Exkretion anzuzeigen (23). Neben der ICG-*Clearance* stehen zur Beurteilung der präoperativen Leberfunktion der LIMAX (*maximum liver function capacity*) und die computergestützte Volumetrie (CT-Volumetrie) zur Verfügung. Beim LIMAX wird ¹³C-Methacetin intravenös appliziert und durch das ausschließlich in der Leber vorkommende Enzym CYP1A2 (Cytochrom-P 1A2) zunächst in Paracetamol und schließlich in ¹³CO₂ verstoffwechselt, das über die Lunge abgeatmet wird und in der Atemluft gemessen werden kann. Die Konzentration des expiratorischen ¹³CO₂ ist hierbei proportional zur Anzahl gesunder Leberzellen und somit zur funktionellen Leberreserve (24). Hierdurch ermöglicht der LIMAX eine Beurteilung der funktionellen Operabilität und der Wahrscheinlichkeit eines postoperativen Leberversagens. Die 3D-CT-Volumetrie hat das Ziel einer virtuellen Resektionsplanung, wobei Tumor- und Leberanatomie exakt dargestellt und die Resektionsgrenzen festgelegt werden können, um eine ausreichende Restgröße der Lebersegmente zu gewährleisten. Zusammenfassend bietet die Kombination der LIMAX mit der CT-Volumetrie die derzeit wahrscheinlich genaueste Maßnahme zur Abschätzung der postoperativen Leberfunktion (24).

Da eine Lebertransplantation nicht nur die Raumforderung, sondern auch die zugrundeliegende chronische Lebererkrankung behandelt, stellt sie eine sinnvolle Therapie mit hervorragenden Langzeitergebnissen dar (21). Die Mailand-Kriterien nennen verschiedene Tumorcharakteristika, die als Voraussetzung für den Erfolg einer OLT bei HCC gelten (20). Den Kriterien zufolge eignen sich Patienten mit Tumoren kleiner fünf Zentimeter, maximal drei Herden mit einer Größe unter drei Zentimetern, fehlender extrahepatischer Manifestation und Gefäßinvasion am ehesten für eine OLT (8, 20, 22). Diese Werte stellen allerdings lediglich Orientierungsgrößen dar, denn Studien legen nahe, dass auch Patienten mit abweichenden Konstellationen langfristig von einer Transplantation profitieren (8, 20). In der Sorge zu restriktiver Selektionskriterien und einer nicht ausreichenden Berücksichtigung einzelner Patientenkollektive wurden die Mailand-Kriterien um weitere Modelle erweitert. Mazzaferro et al. entwickelten beispielsweise als Erweiterung der Mailand-Kriterien die *Up-to-seven*-Kriterien, derer zufolge die Summe aus der Anzahl der Leberknoten und des maximalen Durchmessers des größten Tumorknotens den Wert

von sieben nicht überschreiten dürfe (25). Auch weitere Modelle, wie zum Beispiel die *University-of-California-San-Francisco(UCSF)*- oder die Hangzhou-Kriterien, sind eine sinnvolle Ergänzung der Mailand-Kriterien, wobei die Entscheidung über das therapeutische Prozedere letztlich individuell durch erfahrene Transplantationsmediziner in einer interdisziplinären Prüfung (sog. Acht-Augen-Prinzip) diskutiert werden muss (25, 26).

Bei zunehmenden Wartezeiten durch sinkende Spendebereitschaft verfällt durch Tumorprogress in circa 20 bis 50 % der Fälle der Anspruch auf Transplantation (8, 22). Studien zeigten in diesem Zusammenhang, dass der Mehrwert der Transplantation nur dann erlangt werden kann, wenn die Wartezeit weniger als sechs Monate beträgt (22). Bei einer durchschnittlichen Wartezeit von 517 Tagen kam es in der Vergangenheit durch Tumorwachstum wiederholt zum Auftreten von Kontraindikationen oder zum vorzeitigen Versterben der Patienten (20, 27).

Zur Vorbeugung einer Tumorprogression in der Wartezeit auf ein Spenderorgan haben sich Maßnahmen wie Radiofrequenzablation oder Chemoembolisation bewährt (20). Im Zuge einer Ablation können über einen in das Tumorgewebe eingebrachten Ablationskatheter chemische oder physikalische Verfahren die Verkleinerung und Vernarbung von Tumoren herbeiführen (20). Darüber hinaus stehen weitere, vorwiegend adjuvante Maßnahmen zur Verfügung (20). Im palliativen Setting werden neben den oben genannten Maßnahmen weiterhin Chemotherapeutika eingesetzt, die sowohl systemisch, als auch lokal injiziert werden, insgesamt aber nur geringe Ansprechraten aufweisen (20).

6.3.3. Akutes Leberversagen

Das akute Leberversagen (ALV) ist definiert als eine akute Erkrankung der Leber bei zuvor Lebergesunden, die innerhalb weniger Wochen durch akute Leberinsuffizienz zu Enzephalopathie oder Koma führt (28, 29). Der *Acute Liver Failure Study Group* zufolge unterscheiden sich je nach Zeitpunkt der Enzephalopathie das hyperakute (binnen weniger sieben Tage), akute (binnen sieben bis 28 Tage) und das subakute (nach 28 Tagen bis sechs Monaten) Leberversagen (28). In der westlichen Welt scheint die Hauptursache im medikamentös-induziertem Leberschaden zu liegen, während in Entwicklungsländern virale Infektionen in der Mehrheit der Fälle ursächlich sind (28). Hierbei sind vor allem Hepatitis A, B und E, seltener auch Herpes- und Parvoviren zu nennen (28). In den vergangenen Jahrzehnten wurden mit steigendem Interesse Modelle zur bioartifiziellen Leberunterstützung (sog. Bioreaktoren)

entwickelt, die funktionell aktive und künstlich kultivierte Hepatozyten enthalten und vorübergehend die Leberfunktion unterstützen können (30). Derartige Verfahren werden jedoch noch immer zurückhaltend eingesetzt, da sie einerseits von eingeschränktem Nutzen sind und andererseits zum Auftreten ethischer Bedenken führen. Durch den Einsatz von Bioreaktoren kann zwar eine zunehmende Patientenzahl die Wartezeit bis zum Erhalt eines Spenderorgans überbrücken, gleichzeitig erhöht dies die Anzahl der gelisteten Patienten und in der Summe die Wartezeit (30). Insofern werden extrakorporale Organersatzverfahren nur selten eingesetzt. Da für die Leber keine effektiven Organersatzverfahren verfügbar sind und das akute Leberversagen trotz intensivmedizinischer Maßnahmen mit einer hohen Mortalität einhergeht, stellt die Lebertransplantation die einzige Therapieoption des ALV dar (29).

6.3.4. Kontraindikationen

Absolute Kontraindikationen für die Durchführung einer OLT sind fehlende Patientenadhärenz, fortgeschrittene kardiovaskuläre und -pulmonale Begleiterkrankungen, fortgeschrittenes Patientenalter, unkontrollierte Sepsis, Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom (AIDS), fortbestehender Substanz- und Alkoholabusus, Pfortaderthrombose, maligne Zweiterkrankung sowie extrahepatische Tumormetastasierung (1, 8). Gemäß den Richtlinien zur Organtransplantation ist ein hohes Lebensalter nicht per se ein Ausschlusskriterium, jedoch werden Patienten ab einem Alter von 70 Jahren aufgrund eines hohen operativen Risikos und schlechteren klinischen Outcomes in aller Regel nicht für eine Lebertransplantation gelistet (8).

6.4. Präoperative Evaluationen

6.4.1. Organallokation

Bis zur Einführung des *Model for end stage liver disease-(MELD)-Scores* im Februar 2002 durch das *United Network for Organ Sharing (UNOS)* wurde der *Child-Turcotte-Pugh-(CTP)-Score* zur Organallokation und Dringlichkeitsbeurteilung eingesetzt (8). Der *CTP-Score* graduiert den Schweregrad von Lebererkrankungen anhand der Laborparameter Albumin, INR (*international normalized ratio*) beziehungsweise Quick und Bilirubin und der klinischen Zeichen Aszites und Enzephalopathie (1, 8). Zwar kam der *Score* mehr als 20 Jahre zur klinischen Anwendung, geriet jedoch durch seine eingeschränkte Objektivität zunehmend in Kritik (1).

Unter Berücksichtigung des Serumkreatinin-, -natrium-, Gesamtbilirubin- und INR-Wertes und der Notwendigkeit einer regelmäßigen Dialyse berechnet der MELD-Score das Dreimonatsüberleben (1, 8). Neben dem klassischen lab-MELD-Score, der allein auf oben genannten Laborparametern basiert, existieren als weitere MELD-Varianten der *exceptional-MELD*, *match-MELD* und *pediatric-MELD* (31). Der *match-MELD* wird bei Patienten angewandt, die mindestens eines der vorgegebenen Standardkriterien aufweisen, darunter unter anderem das Vorliegen eines HCC oder einer PSC. Wird die Transplantationsdringlichkeit begründeterweise weder durch den lab-MELD, noch durch die Zusatzkriterien des *match-MELD* adäquat wiedergespiegelt, können Kliniken einen Antrag auf so genannte *Non-Standard-Exception* bei der Vermittlungszentrale stellen - dies entspricht der Allokation anhand des *exceptional-MELD* (32).

In Deutschland erfolgt die Organisation der Organtransplantation und -allokation gemeinsam mit den Beneluxstaaten, Österreich, Slovenien und Kroatien über die gemeinsame Organisation Eurotransplant (1).

6.4.2. Spenderevaluation

Den Großteil der Spenderorgane stellen Leichenorgane bei Hirntod (sog. „Kadaver-Transplantation“) dar. Seltener kommen Organe durch Lebendspende zum Einsatz, die Verwendung von Organen sog. *non-heart-beating*-Spender ist in Deutschland verboten (1). Bei steigender Diskrepanz zwischen Organbedarf und -verfügbarkeit und dem damit verbundenen Anstieg der Mortalität expandierte die Bundesärztekammer die Spenderkriterien mit aggressiverer Organnutzung (33). Dies führte dazu, dass in den vergangenen Jahren mit steigender Häufigkeit auf alternative Organquellen zurückgegriffen wurde (1). Hierzu gehören die Leberlebendspende (LDLT), Split-Lebertransplantation, Verpflanzung marginaler Organe, die partielle Lebertransplantation und die bereits oben erwähnte *non-heart-beating*-transplantation, wobei Letztere nur in wenigen Ländern praktiziert wird (1). Dies begünstigte einerseits die Reduktion der Wartelistenmortalität, andererseits kam es durch reduzierte Organqualität zu einer Reduktion des Patienten- und Transplantatüberlebens (33).

Im Rahmen der Lebendspende werden der rechte oder linke Leberlappen eines gesunden Lebendspenders genutzt, der obligat in *Piggy-back*-Technik mit Erhalt der Empfänger-Cava implantiert wird. Die LDLT gewinnt durch den Spenderorganmangel zunehmend an Bedeutung

und stellt eine etablierte Alternative zu Leichenorganen dar (34). Daneben existiert die Split-Spende, bei der die Spenderleber in-situ oder ex-situ in zwei vollwertige Anteile geteilt und durch zwei Empfänger genutzt werden kann (34). Im experimentellen Setting wird außerdem der Einsatz von tierischen Organen, so genannten Xenotransplantaten, überprüft und erprobt, wobei bislang keine vielversprechenden Methoden etabliert wurden (1).

6.4.3. Chirurgische Transplantationstechniken: Organentnahme

Die Multiorganentnahme bei hirntoten Patienten findet regelhaft im Spenderkrankenhaus statt und beginnt mit einer medianen Laparotomie unterhalb des Xiphoids mit Freilegung relevanter Leitstrukturen (1, 35). Zunächst wird die Bauchhöhle exploriert und das Spenderorgan in-situ auf makroskopische Charakteristika beurteilt (35). Zum Teil erfolgt außerdem eine mikroskopische Beurteilung im Zuge einer Schnellschnittdiagnostik (35). Die Aorta wird zwischen Arteria mesenterica superior und Aortenbifurkation freigelegt und die Abgänge dargestellt, die Arteria mesenterica inferior wird abgebunden (35). Weiterhin erfolgt die Darstellung der infrarenalen Vena cava und der Strukturen im Ligamentum hepatoduodenale (35). Anschließend wird die Leber im Uhrzeigersinn mobilisiert mit Beginn am linken Leberlappen. Unmittelbar nach Durchtrennung der arteriellen Gefäße erfolgt die Schwerkraftperfusion mit Konservierungslösungen, wie zum Beispiel Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-(HTK)-Lösung (35). Indem die Vena cava suprahepatisch und im Bereich der Iliakalbifurkation durchtrennt wird, ist die Spenderleber nun vollständig mobil und sollte zeitnah transplantiert werden, um eine kalte Ischämiezeit (*cold ischemia time*, kalte Ischämiezeit) von unter zwölf Stunden zu gewährleisten (35).

6.5. Postoperativer Verlauf

6.5.1. Induktion einer Immunsuppression

Ziel der Immunsuppression nach Organtransplantation ist es, gegen das Transplantat gerichtete immunologische Reaktionen und somit eine Organabstoßung zu unterbinden. Dabei bewegt sich die Immunsuppression auf einem schmalen Grat zwischen der Prävention einer Organabstoßung und der Begünstigung nachteiliger Nebeneffekte, insbesondere opportunistischer Infektionen. Einen der wichtigsten Bestandteile der Induktionstherapie bildet die Gruppe der Kortikosteroide. Ihre immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekte entfalten die Kortikosteroide über

die Bindung eines intrazellulär gelegenen Glukortikoidrezeptors, wobei der Rezeptor-Liganden-Komplex durch direkte und indirekte Modulation der Transkriptionsrate das Immunsystem steuert. Therapeutisch genutzte immunsuppressive Effekte erklären sich einerseits durch eine Hemmung der *nuclear factor kappa light chain-enhancer*(NF- κ B)-vermittelten Entzündungsmediatorsynthese und andererseits durch Hemmung von Immunzellen (insbesondere Lymphozyten, Eosino- und Basophile). Da der Reichtum an potenziellen Nebenwirkungen die Vorteile der Kortikosteroidtherapie deutlich schmälert ist ihr Einsatz meist auf die Dauer von nur wenigen Monaten begrenzt.

Initial werden je nach Zentrum zum Teil auch mono- oder polyklonale Antikörper eingesetzt. Die Unterscheidung der im Rahmen der Induktionstherapie eingesetzten Antikörper in zwei Gruppen erfolgt anhand ihrer Fähigkeit zur T-Zell-Depletion. Durch Bindung polyklonaler (z. B. Anti-Thymozyten-Globulin, Thymoglobulin) oder monoklonaler Antikörper (z. B. Alemtuzumab) an T-Zell-Rezeptoren erfolgt die komplementvermittelte Zytolyse. Aufgrund der zentralen Rolle der T-Zellen in der Vermittlung einer akuten Abstoßungsreaktion scheint ihre Depletion zur Prävention einer ACR und Induktion einer immunologischen Toleranz beizutragen.

6.5.2. Langzeit-Immunsuppression

Heruntergebrochen wirken Immunsuppressiva durch Blockade relevanter Immunreaktionen, meist durch Inhibition der De-Novo-Nukleotidsynthese oder durch Hemmung zellulärer Signaltransduktionswege. Die Hemmung der De-Novo-Nukleotidsynthese kann sowohl auf Ebene des Purins, als auch des Pyrimidins erfolgen. Diesen Mechanismus machen sich unter anderem die Immunsuppressiva Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Azathioprin zu Nutze.

MMF wird nach oraler Aufnahme durch Esterasen in Mycophenolsäure umgewandelt. Hierbei handelt es sich um einen potenten nicht-kompetitiven Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydroxygenase, die eine Schlüsselfunktion in der Synthese aller Guanosin-Nukleotide besitzt und insbesondere in aktivierten B- und T-Zellen exprimiert wird. Während andere Zellreihen bei der Purinsynthese auf Wiederverwertungsprozesse zurückgreifen können, sind Lymphozyten auf die metabolisch aufwändigere De-Novo-Synthese von Purinen angewiesen (36). Aus diesem Umstand ergibt sich ein besonders auf Lymphozyten wirkender zytostatischer Effekt von MMF.

Azathioprin hemmt ebenfalls, jedoch andersartig, die Purinsynthese und wirkt zudem als Antimetabolit. Als Prodrug wird Azathioprin nach Aufnahme rasch in das biologisch aktivere 6-

Mercaptopurin umgewandelt (37). Dieses hemmt die Glutamin-Phosphoribosyl-Pyrosphosphat-Amidotransferase und somit die Synthese von Purinnukleotiden. Zusätzlich wird es als falscher Baustein in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) eingebaut, was einen Funktionsverlust mit Apoptose der Zelle zur Folge hat (37).

Zu den Calcineurin-Inhibitoren gehört einerseits das Ciclosporin, das seine Wirkung durch Hemmung des Cyclophilin entfaltet. Zudem werden Tacrolimus und Pimecrolimus den Calcineurin-Inhibitoren zugeordnet, die durch Bindung des *FK506-binding*-Protein (FKBP) wirken (38). In der Summe hemmen sie allesamt die Proteinphosphatase Calcineurin und somit Transkriptionsfaktoren, die für die Synthese von Zytokinen nötig sind. Es kommt in der Konsequenz insbesondere zu einer Hemmung der lymphozytären Immunreaktionen.

Rapamycin (auch bekannt unter Sirolimus/ Everolimus) ist ein weiterer immunsuppressiv wirkender Arzneistoff, der aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert wird. Es setzt an der Seronin-Tyrosin-Kinase mTor (*mechanistic target of Rapamycin*) an, das eine Schlüsselfunktion in der intrazellulären Signaltransduktionskaskade und somit in der Regulation des Zellwachstum und der Proteinbiosynthese hat (39).

Darüber hinaus stehen so genannte Biologika zur Verfügung, die ihre Wirkung durch spezifische Bindung an unterschiedliche Strukturen der Immunkaskade entfalten.

6.5.3. Frühkomplikationen

Das Spektrum möglicher postoperativer Komplikationen umfasst einerseits chirurgische Komplikationen wie intraabdominelle Blutungen, Gefäß- und Gallenwegskomplikationen. Andererseits sind unspezifische nicht-chirurgische Komplikationen wie Infektionen und Abstoßungsreaktion im postoperativen Verlauf ebenfalls möglich (1). Die im frühzeitigen oder langfristigen Verlauf nach LTx auftretenden Komplikationen können die Funktion und das Überleben des Spenderorgans substantiell gefährden (40).

Die Inzidenz postoperativer vaskulärer Probleme liegt zwischen zwei und 25 %, wobei bei derartigen Komplikationen in etwa 50 % der Fälle die Notwendigkeit einer Re-Transplantation besteht (1). Bei den möglichen arteriellen Komplikationen handelt es sich unter anderem um Anastomosenblutungen, thrombotische Gefäßokklusion und Aneurysmabildung (1). Venöse Komplikationen treten mit einer Inzidenz von ein bis drei % im Vergleich deutlich seltener auf und betreffen vorwiegend die inferiore Vena cava und Portalvene, häufig im Sinne einer

Portalvenenthrombose (1). Insgesamt scheint die chirurgische Akkuratess in der Gefäßrekonstruktion eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Vermeidung chirurgischer Komplikationen zu sein, da Einschränkungen der Organperfusion häufig in einer schlechten Organfunktion resultieren und sekundär das Auftreten von Komplikationen begünstigen (1). Demgegenüber ereilt etwa zehn bis 20 % aller Patienten nach LTx das Schicksal einer Gallenwegskomplikation, welche in Form von Galleleckage, Gallenwegsobstruktion/-striktur, Gallensteinen oder seltener als biliärer Abszess oder Hämobilie auftreten können (1, 41). Basierend auf dem Zeitpunkt des Auftretens werden biliäre Komplikationen in Früh- und Spätkomplikationen eingeteilt (1, 41). Das Auftreten wird durch Naht-Insuffizienzen und -Stenosen, Drainagendislokation und akute Thrombosen der Arteria hepatica begünstigt (41). Die große Mehrheit der auftretenden Komplikationen lässt sich durch endoskopische Interventionen beheben, sodass Reoperationen jenen Läsionen vorbehalten bleiben, die andernfalls nicht therapeutisch zugänglich sind (41).

6.5.4. Transplantatfunktionsstörungen

Die primäre Funktion des Lebertransplantates ist einer der entscheidenden Faktoren für den postoperativen Verlauf. Dabei wird zwischen Primärfunktion, primärer Dysfunktion (*initial poor function*, IPF) und primärer Nichtfunktion (*primary graft non-function*, PGNF) unterschieden (42). Die Abgrenzung zwischen IPF und PGNF erfolgt anhand des Schweregrades der Dysfunktion, der anhand laborchemischer und klinischer Parameter abgeschätzt wird (42). So definiert die UNOS die PGNF beispielsweise als irreversiblen Transplantatzustand, der innerhalb der ersten zehn Tage nach LTx eine notfallmäßige Re-Transplantation notwendig macht (42). Die PGNF tritt in circa ein bis acht % der Fälle auf und stellt eine ernstzunehmende Komplikation dar, da sie nicht selten zum schweren toxischen Lebersyndrom, progredienten Multiorganversagen und Koma führt und eine hohe Mortalität aufweist (3).

6.5.5. Spätkomplikationen

Die im späteren klinischen Verlauf auftretenden Langzeitkomplikationen stehen häufig in enger Verbindung mit den Nebenwirkungen einer langfristigen immunsuppressiven Therapie (3, 43). Eine häufige Arzneimittelnebenwirkung und somit Spätkomplikation ist das metabolische Syndrom, das per definitionem mit Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Adipositas und arterieller

Hypertonie einhergehen kann (3, 43). Weiterhin kommt es gehäuft zu kardiovaskulären Einschränkungen, De-Novo-Neoplasien und bei Einsatz nephrotoxischer Medikamente zu einem progredienten Nierenversagen (3, 43).

Je nach zugrundeliegender LTx-Indikation besteht darüber hinaus die Gefahr eines Rezidivs der Grunderkrankung (43). Durch den Einsatz antiviraler Arzneistoffe und Passivimmunisierung mit Hepatitis-B-Immunglobulin kann die Rate an Hepatitis-B-Virus(HBV)-Hepatitis-Rezidiven von 75 % auf 20 % gesenkt werden (3). Derartige Vorbeugungsmaßnahmen sind bei der Hepatitis-C-Virus-Infektion weitaus weniger erfolgreich, sodass sich in mehr als 50 % der Fälle Rezidive einer HCV-Hepatitis ereignen (3).

6.6. Akute zelluläre Rejektion

Eine wichtige Einflussgröße für die Transplantatqualität und -funktion ist das Vorliegen einer Abstoßungsreaktion. Je nach Zeitpunkt des Auftretens wird zwischen hyperakuter, akuter und chronischer Rejektion unterschieden (43). Die hyperakute Rejektion tritt innerhalb weniger Minuten bis Stunden auf, ist Antikörper- oder Komplement-vermittelt und in aller Regel irreversibel (43). Demgegenüber kann die akute Abstoßung, die meist zellulär vermittelt wird und innerhalb von Tagen bis Monaten auftritt, meist durch Anpassung der immunsuppressiven Medikation suffizient behandelt werden (43). Studien zeigen, dass die ACR etwa 20 bis 40 % der lebertransplantierten Patienten betrifft (2, 44). Der Weltkongress der Gastroenterologie (*World Congress of Gastroenterology*, WCOG) definierte die akute zelluläre Rejektion 1994 als „*an immunological reaction to the presence of a foreign tissue or organ, which has the potential to result in graft dysfunction and failure.*“ (45, 46). Demzufolge handelt es sich dabei um eine Reaktion des Immunsystems auf körperfremdes Gewebe, die potenziell in einer Transplantatdysfunktion oder gar in einem Transplantatversagen resultieren kann (45, 46). Es handelt sich um eine Entzündungsreaktion mit Affektion der interlobulären Gallengänge und des hepatischen Gefäßendothels, deren Ursache in der genetischen Disparität zwischen Spender und Empfänger zu finden ist (46).

6.6.1. Pathomechanismen der ACR

Antigene des Spenderorgans, die das Immunsystem des Empfängers aktivieren, sind sog. Alloantigene, diese sind vorwiegend Major- und Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (47, 48). Bei dem Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) handelt es sich um eine Gruppe von Genen auf Chromosom sechs, die für so genannte *human leukocyte antigens* (HLA) kodieren, die ihrerseits als zelluläre Oberflächenproteine an verschiedenen Immunmechanismen beteiligt sind (47). Dabei werden MHC-I- und -II-Rezeptoren mit jeweils abweichendem Vorkommen und differenter Funktion unterschieden. MHC-I-Rezeptoren finden sich vorwiegend auf kernhaltigen Zellen und präsentieren zum einen auf gesunden Zellen zelleigene Peptidfragmente, zum anderen können Pathogene von dendritischen Zellen aufgenommen, verarbeitet und über die MHC-I-Moleküle an Immunzellen präsentiert werden (47). MHC-II-Rezeptoren finden sich wiederum ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen und präsentieren somit Peptidfragmente intrazellulär prozessierter Antigene auf ihrer Oberfläche (47). Über einen Ko-Rezeptor (CD4+ beziehungsweise CD8+) aktivieren diese MHC-Rezeptoren schließlich unterschiedliche Subpopulationen von T-Zellen. CD8+-T-Zellen (regulatorische und zytotoxische T-Zellen) benötigen für die T-Zell-Aktivierung das ko-stimulatorische Signal eines MHC-I-Rezeptors, CD4+-T-Zellen (T-Helferzellen) das eines MHC-II-Rezeptors (47). Auch bei den Minor-Histokompatibilitätskomplexen handelt es sich um Zelloberflächenpeptide, die durch genetische Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) eine große interindividuelle Variation aufweisen und somit zwischen Spender- und Empfängerzellen Immunreaktionen auslösen können (47).

Die Alloantigenerkennung kann dabei direkt über die Erkennung von intakten Fremd-MHC-Molekülen oder indirekt über die Erkennung von Fremd-MHC-Peptidfragmenten in MHC-II-Rezeptoren erfolgen (47). Da im Zuge der Transplantation neben lebereigenen Zellen auch Immunzellen des Spenders wie antigenpräsentierende Zellen (APC) als so genannte „Passagier-Leukozyten“ verpflanzt werden, kann eine direkte Aktivierung des Empfängerimmunsystems erfolgen (49). Da allogene und autogene MHC-Moleküle eine gewisse Strukturähnlichkeit besitzen, sind allogene MHC-Moleküle dazu in der Lage, T-Zellen zu binden und zu aktivieren (49). Hierbei handelt es sich um den direkten Signalweg. Der indirekte *Pathway* erfolgt durch Erkennung, Prozessierung und Präsentation allogener Antigene in MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche Empfänger-eigener APC, die dieses an Immunzellen präsentieren (47). Auf die

Alloantigenerkennung reagieren T-Zellen über diverse Signaltransduktionswege (vorwiegend Calcineurin-, MAP-K-Signalweg) mit einer klonalen Expansion, Transkriptionsfaktorinduktion und Aktivierung von Zytokinen, darunter Interleukin-2 (IL-2) (2, 50). Das aus aktivierten T-Zellen freigesetzte Zytokin Interleukin-2 bindet im Sinne eines Selbstverstärkungsmechanismus an Interleukin-2-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen, wodurch die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation über den mTor-Signalweg verstärkt wird (2, 50). Insofern stellt Interleukin-2 ein attraktives therapeutisches *Target* dar, das sich beispielsweise Basaliximab in der Prävention der ACR zu Nutze macht (2). Diese Mechanismen sind Teil des inerten Immunsystems und werden vorwiegend zellulär vermittelt.

Derzeit geht man davon aus, dass T-Zellen nur dann optimal aktiviert werden, wenn sie neben der T-Zell-Rezeptor-(TCR)-Stimulation zusätzlich ein ko-stimulatorisches Signal erfahren (48). Wichtige ko-stimulatorische Signalwege in diesem Zusammenhang sind die Interaktion von CD28- und CD152-Rezeptoren auf T-Zellen mit CD80- und CD86-Rezeptoren auf APCs (50). In Abwesenheit dieser Ko-Stimulation fällt die Zelle in den Zustand der Anergie, zeigt also keinerlei immunologische Reaktion auf Antigenstimulation. Insofern ist die Exploration dieser kostimulatorischen *Pathways*, mit dem Ziel einer therapeutischen Blockade, ein vielversprechender Ansatz in der aktuellen Forschung (48).

In der Transplantationsmedizin werden darüber hinaus auch Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktionen beobachtet (48). Hierbei handelt es sich vorwiegend um Antikörper gegen allogene MHC-I- und -II-Strukturen, die durch Monozyten- und Komplementaktivierung zu einer immun-vermittelten Transplantatschädigung führen (48). Die Leber scheint diesen Antikörper-vermittelten Rejektionsmechanismen gegenüber jedoch eine gewisse Immunität zu besitzen (45, 48). Im Zuge des Privatkreislaufs der Vena portae hepatis geraten die Leberzellen ständig mit Nahrungsmittelantigenen und bakteriellen Endotoxinen aus dem Gastrointestinaltrakt in Kontakt (48). Diese Dauerexposition führt zur so genannten „Endotoxin-Toleranz“ der hepatischen T-Zellen gegenüber bestimmten Antigenen (48). Es besteht daher die Annahme, dass diese Mechanismen zur spontanen Toleranz, die bei einigen wenigen Patienten ohne immunsuppressive Medikation beobachtet wurde, beitragen könnten (48).

6.6.2. Diagnostik der ACR

Trotz der standardmäßigen Anwendung von immunsuppressiven Arzneimitteln stellt die akute Abstoßung mit einer Inzidenz von 20 bis 40 % weiterhin eine häufige Komplikation dar (2, 48). Die Symptome der akuten Abstoßung sind sehr unspezifisch und reichen von Malaise über Bauchschmerzen, bis Aszites und Ikterus, wobei keines dieser Symptome pathognomonisch für eine ACR ist (2). Fieber, Hepatosplenomegalie, Veränderungen von Gallenmenge und -farbe und Erhöhung der Serum-Bilirubin- und -Transaminasenkonzentration gehören zu den klinischen Zeichen einer akuten Rejektion (2). Laborchemischen Parametern fehlt jedoch die notwendige Sensitivität und Spezifität, da Veränderungen dieser Laborparameter häufig auch bei einer Vielzahl anderer Komplikationen auftreten (2). Vor diesem Hintergrund stellt die Leberbiopsie weiterhin den diagnostischen Goldstandard dar und ermöglicht darüber hinaus die Abgrenzung von klinisch zum Teil sehr ähnlich imponierenden Transplantatfunktionsstörungen (2). Hierbei ist das Vorliegen mindestens zwei von drei der folgenden Kriterien für die Diagnose der ACR notwendig: 1) gemischtes, vorwiegend lymphozytäres entzündliches Infiltrat in der portalen Trias, 2) Gallengangsentzündung beziehungsweise entzündliche Gallenwegsdestruktion und 3) Endotheliitis oder Venulitis (46). Zur Diagnostik der ACR wird häufig das so genannte Banff-Klassifikationssystem eingesetzt (46). Dieses System umfasst einerseits Diagnosekriterien und andererseits den Banff *rejection activity index* (RAI). Den diagnostischen Kriterien des Banff zufolge kann eine ACR in mild (Grad I), moderat (Grad II), schwer (Grad III) und fraglich eingeteilt werden (46). Weitere Details hierzu sind in Tabelle 1 zu entnehmen. Der RAI umfasst die drei oben genannten histologischen Charakteristika, die in ihrem Ausmaß jeweils auf einer Skala von null bis drei graduiert werden (46). Durch Addition der einzelnen Skalen erhält man schließlich den Schweregrad der ACR auf Basis der Histologie, der auf einer Skala von null bis neun angegeben wird (46). Entsprechend wird eine Abstoßung mit einem $RAI \leq 4$ als milde, einem RAI von 5 bis 7 als moderat und von ≥ 8 als schwer klassifiziert.

Durch Abweichung von Biopsatmenge und -qualität, sowie Interobserver-Variabilität ist die diagnostische Genauigkeit der Biopsie bei Verdacht auf ACR dennoch eingeschränkt (2, 51).

Tabelle 1: Banff-Kriterien einer ACR (Quelle: eigene Darstellung, in Anlehnung an (50))

Grad	Beschreibung
I (mild)	geringes entzündliches Infiltrat, in der Minderheit der portalen Trias, geringe Gallenwegsdestruktion, geringe Endotheliitis ohne Vorliegen von Leberzellnekrosen
II (moderat)	moderates, die Membran des Portalfeldes überschreitendes Infiltrat, umschriebene Endotheliitis und Gallengangsdestruktion, Einzelzellnekrosen
III (schwer)	über Grad II hinausgehende Veränderungen, zusätzlich konfluierende Leberzellnekrosen
fraglich	entzündliches portales Infiltrat ohne, dass die Kriterien einer akuten Rejektion erfüllt werden

6.6.3. Notwendigkeit alternativer diagnostischer Methoden

Die bioptische Sicherung von Lebergewebe ist seit Jahrzehnten Goldstandard in der Diagnostik der ACR. Dennoch geht diese neben der limitierten diagnostischen Genauigkeit mit weiteren Nachteilen einher. Zum einen birgt sie die Gefahr zum Teil schwerwiegender Komplikationen, zum Anderen erfordert sie einen hohen personellen und finanziellen Aufwand. Aufgrund dessen wird die Durchführung einer Punktion meist herausgezögert, was zu einer Verzögerung der Diagnosestellung und Therapie und somit zu einer Verschlechterung des *Outcomes* führen kann. Insofern wurde in den vergangenen Jahren mit großem Interesse die Entwicklung und Etablierung nicht-invasiver Methoden und Biomarker zur Diagnostik der ACR verfolgt (2).

Bei einem Biomarker handelt es sich um einen Parameter, der objektiv gemessen und als Indikator für diverse biologische Prozesse eingesetzt werden kann (2, 51). Zur Qualitätsbeurteilung eines Biomarkers bieten sich die folgenden fünf Kriterien an: 1) Sensitivität, Spezifität und *Receiver-Operating-Characteristic-Kurve* (kurz: ROC-Kurve, Grenzwertoptimierungskurve), 2) Abgrenzbarkeit von anderen Pathologien, 3) Messung mittels effizienter, leicht verfügbarer Testverfahren, 4) Etablierung an einer ausreichend großen Studienpopulation und 5) unabhängige Validierung des Biomarkers (2). Die diesbezüglich bislang unternommenen Bemühungen fanden vorwiegend im Bereich Inflammations-assoziiierter Serummarker statt. Hierbei wurde eine Vielzahl an Biomarkern, darunter beispielsweise CD28+-T-Zellen oder löslicher IL-2-Rezeptor, erforscht, deren Nachteil vorwiegend in der mangelnden Abgrenzbarkeit zu infektiösen Komplikationen liegt (2).

6.6.4. Metabolomics

Dank des technologischen Fortschritts und der Weiterentwicklung moderner Hochdurchsatztechnologien kommen in der Forschung zunehmend neue erfolgversprechende Technologien auf, darunter *Metabolomics* oder *Proteonomics*, deren Einsatz auch im Zuge der ACR-Diagnostik getestet wird (52). Der Suffix *-omics* beschreibt ein Teilgebiet der modernen Biologie, die sich mit der Charakterisierung und Quantifizierung der Gesamtheit ähnlicher Teilelemente beschäftigt. So setzt sich das Genom mit der DNS, das Proteom mit der Gesamtheit der Proteine und das Metabolom mit der Gesamtheit der Metabolite auseinander. Hierbei werden kleine Moleküle (Metabolite) mit einer Masse von bis zu 1500 Dalton umfassend analysiert (52). Als biochemischer Endpunkt der genetischen Information erlaubt das Metabolom Aussagen über die Funktion biologischer Systeme und schließt somit die zuvor bestehende Lücke zwischen Genotyp und Phänotyp (52). Metabolomische Untersuchungen ermöglichen es, physiologische und pathologische Stoffwechselprozesse, sowie den Einfluss endogener (genetische Prädisposition) und exogener Umwelteinflüsse abzubilden (2). Dabei werden zwei unterschiedliche Herangehensweisen unterschieden: *targeted* und *untargeted* Metabolomics (53). *Targeted* Metabolomics meint die zielgerichtete Messung bereits bekannter Moleküle und verfolgt in der Regel eine konkrete Fragestellung. Demgegenüber zielt der weitreichende Ansatz (*untargeted* Metabolomics) auf die Detektion eines möglichst großen Spektrums unbekannter Moleküle ab.

Im Gegensatz zur Messung einzelner Parameter, gewähren Multi-Analyt-Ansätze der *omics*-Technologien durch Darstellung molekularer Signaturen die Möglichkeit eines deutlich höheren, weiter umfassenden Informationsgehaltes (54). Bislang wurden traditionellerweise einzelne Metaboliten als Biomarker für komplexe Stoffwechselveränderungen oder angeborene genetische Stoffwechselerkrankungen eingesetzt (54). Als klassisches Beispiel kann hier die serologische Phenylalaninkonzentration zur Diagnose einer Phenylketonurie genannt werden. Neuere metabolomische Technologien gehen über die klassische klinische Chemie hinaus und sind dazu in der Lage, eine große Anzahl an Metaboliten präzise zu analysieren (54). Laut *human metabolome database* (HMDB) umfasst das menschliche Metabolom rund 114.100 Metaboliten, von denen bis April 2020 etwa 18.598 detektiert und quantifiziert wurden. Da das Metabolom ein offenes System darstellt und durch zahlreiche Störfaktoren wie Ernährung, Umwelt und das Mikrobiom ständig beeinflusst wird, stellen metabolomische *Assays* im Vergleich zu Genomics

und Proteomics eine deutlich größere Herausforderung dar (54). Erschwerend kommt hinzu, dass es sich bei Transplantat-Empfängern um eine hochkomplexe Patientenpopulation handelt, die nicht selten durch Ko-Morbiditäten und Polypharmazie zahlreiche Störfaktoren mitbringen (54). Obwohl der Bereich der *-omics* ein vielversprechendes Potenzial besitzt, hat bislang keine Studie Biomarker hervorgebracht, die das experimentelle Stadium verlassen und ihre Eignung als Biomarker im klinischen Alltag zeigen konnten (54). Gleichmaßen konnte bisher kein Biomarker identifiziert werden, der ausreichend potent ist, um die Leberbiopsie als Goldstandard in der ACR-Diagnostik zu ersetzen (2).

Die Verwendung von Trockenblutproben geht auf Doktor Robert Guthrie zurück, der die Gewinnung von Trockenblut auf Guthrie-Filterpapier-Karten zum *Screening* auf Phenylketonurie und Galaktosämie bereits 1963 einführte (55). Durch Fortschritte der Analysetechniken und Entwicklung von Hochdurchsatztechnologien konnten seither sowohl Sensitivität als auch Durchsatz gesteigert werden (55). Insofern wird die Analyse von Trockenblut nicht nur beim Neugeborenen-*Screening*, sondern auch für toxikologische Untersuchungen oder zur Detektion seltener genetischer Stoffwechselerkrankungen (z. B. Morbus Fabry) inzwischen standardmäßig eingesetzt (56). Mit ihren Vorteilen in der vereinfachten Probengewinnung, -lagerung und dem unkomplizierten Probentransport besitzt die Nutzung von Trockenblut außerdem das Potenzial, sich im Bereich der *-omics* zu behaupten (56). Durch die genannten Vereinfachungen im Arbeitsablauf bietet die Trockenblutanalytik nicht nur die Möglichkeit der Kosteneinsparung, sondern auch der Erweiterung auf ein völlig neues Patienten-Klientel. Beispielsweise bestünde die Möglichkeit der Probengewinnung in der Häuslichkeit oder in strukturschwachen Regionen mit eingeschränkter Gesundheitsversorgung (57). Vergleichbar mit der Blutzuckerselbstmessung bei Patienten mit Diabetes mellitus könnten lebertransplantierte Patienten nach intensiven Schulungsprogrammen die Transplantatfunktion selbstständig überwachen. Auf Basis der in dieser Studie identifizierten Biomarker könnte ein *Assay* entwickelt und entsprechende technische Geräte bereit gestellt werden. Die Entwicklung eines auf vergleichbaren non-invasiven Methoden basierenden Biomarkers könnte eine frühzeitige Diagnose und Therapie ermöglichen, einen abstoßungsbedingten Transplantatverlust abwenden und womöglich die Biopsie als Goldstandard ersetzen. Durch Reduktion hospitalisierungspflichtiger Komplikationen und abstoßungsbedingter Re-Transplantationen können ferner Behandlungskosten reduziert und das Gesundheitssystem entlastet werden.

6.4. Fragestellung

Ziel dieser Studie ist es, die Eignung der Trockenblutanalytik für die Diagnose der ACR nach OLT zu prüfen. Anhand einer Trockenblutprobe sollen Stoffwechselprofile lebertransplantierte Patienten im Sinne der *untargeted Metabolomics* erfasst werden. Im Idealfall sollen hierbei spezifische Metabolitmuster identifiziert werden, die als prädikative Marker für die frühzeitige Diagnose einer akuten zellulären Abstoßung eingesetzt werden können. Dies würde den Verzicht auf eine Biopsie und im Idealfall eine Verlagerung des Transplantatmonitorings in den ambulanten Sektor ermöglichen.

Hieraus ergibt sich folgende Fragestellung:

- Können metabolomische Biomarker in Trockenblutproben identifiziert werden, die sich für die Prädiktion und Diagnostik der akuten zellulären Rejektion bei lebertransplantierten Patienten eignen?

7. Material und Methodik

7.1. Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive Observationsstudie ohne jegliche Intervention. Sie verfolgt das Ziel, metabolomische Biomarker nach Lebertransplantation im Blut zu beschreiben und evaluieren. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin mit der Antragsnummer EA1/193/16 lag vor Studienbeginn vor.

7.2. Rekrutierung und Studienkohorten

Die im Rahmen der Studie rekrutierten Patienten wurden entsprechend des an ihnen vorgenommenen medizinischen Eingriffs in drei Patientengruppen eingeteilt. Bei Gruppe A handelt es sich um Patienten, die sich im Zeitraum zwischen Dezember 2016 und Januar 2018 an der Chirurgischen Klinik am Campus Virchow-Klinikum der Charité einer Lebertransplantation unterzogen. Bei Verdacht auf eine akute Abstoßung wurde eine Biopsie der Transplantatleber durchgeführt und eine zusätzliche Kapillarblutprobe gewonnen. Anschließend wurden die Patienten in die Subgruppen A1 (bioptisch gesicherte ACR) und A2 (histologisch kein Hinweis für eine ACR) aufgeteilt. Eine Zuordnung einer Blutprobe in Gruppe A1 (n = 13) oder A2 (n = 27) war nur möglich, sofern diese innerhalb weniger Tage vor oder nach der Leberbiopsie gewonnen wurde. Eine Entnahme von Lebergewebe, die ausschließlich dem Zwecke dieser Studie diente, erfolgte nicht.

Die Gruppen B und C stellen die Kontrollgruppen dar. Patienten, die an einer Leberzirrhose oder einem akuten Leberversagen erkrankt waren und zwischen Dezember 2016 und Mai 2018 eine Blutentnahme erhalten haben, wurden Gruppe B zugeordnet (n = 26). Die Betrachtung dieser Patienten ermöglicht die Darstellung potenziell krankheitsspezifischer Metabolitmuster und die Abgrenzung transplantations-assoziiierter metabolischer Veränderungen von bereits im Frühstadium einer Lebererkrankung stattfindenden Stoffwechselmodifikationen. Um eine Vergleichbarkeit der Probanden zwischen den einzelnen Gruppen zu gewährleisten, erfolgte die Aufnahme von Patienten in Gruppe C (n = 25) nach dem Quotenauswahlverfahren. Patienten, die sich im Zeitraum zwischen Januar 2018 und Mai 2018 operativ eine Hernie revidieren ließen, den Einschlusskriterien entsprachen und zur Studienteilnahme bereit waren, wurden inkludiert. Zusätzlich wurden Patienten in Kontrollgruppe C aufgenommen, die sich im Zeitraum zwischen April und Juni 2017 einer Leberlebenspende unterzogen. Da der Organismus durch operative

Eingriffe nicht nur Stressreaktionen, sondern auch inflammatorischen Prozessen unterworfen ist, besteht durch Kontrollgruppe C die Möglichkeit, operations-induzierte Stoffwechselveränderungen aufzudecken und sie in der Auswertung der postoperativen Transplantatfunktion zu berücksichtigen.

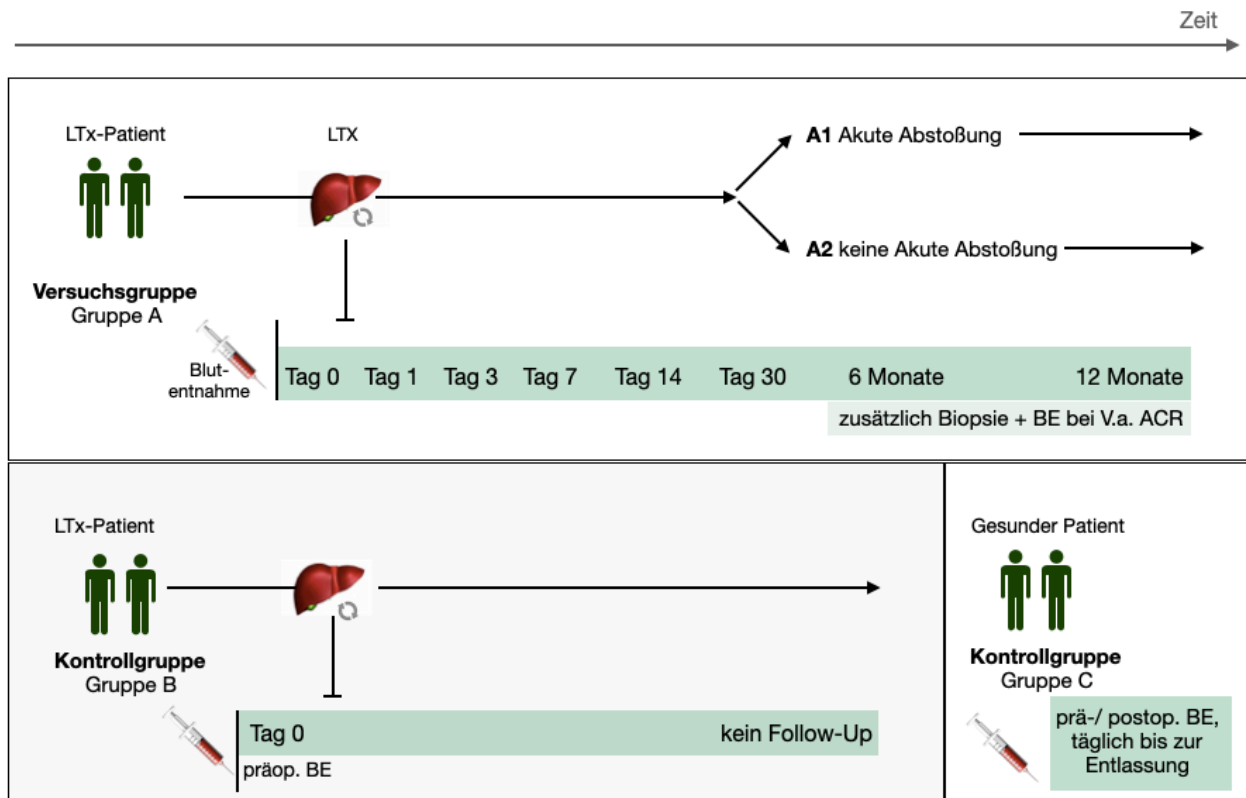


Abbildung 3: Blutentnahme-(BE)-Zeitpunkte der einzelnen Studienkohorten, Quelle: eigene Darstellung, Abkürzungen: ACR = akute zelluläre Rejektion, BE = Blutentnahme, LTx = Lebertransplantation, präop. = präoperativ, postop. = postoperativ

7.3. Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Rekrutierung der Patienten wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

Einschlusskriterien für Gruppe A:

- Alter: ≥ 18 Jahre
- Geschlecht: männlich oder weiblich
- Keine Schwangerschaft
- Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten
- Schriftliche Einwilligung der Patienten
- Aufklärungs- und Einwilligungsfähigkeit
- Biopischer Nachweis (Gruppe A1) bzw. Ausschluss (Gruppe A2) einer ACR

Einschlusskriterien für Gruppe B:

- Alter: ≥ 18 Jahre
- Geschlecht: männlich oder weiblich
- Keine Schwangerschaft
- Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten
- Schriftliche Einwilligung der Patienten
- Aufklärungs- und Einwilligungsfähigkeit
- Patienten, mit einem akuten oder akut-auf-chronischen Leberversagen

Einschlusskriterien für Gruppe C:

- Alter: 30-70 Jahre
- Geschlecht: männlich oder weiblich
- Keine Schwangerschaft
- Schriftliche Einwilligung der Patienten
- Aufklärungs- und Einwilligungsfähigkeit
- Operativer Eingriff: offene/ geschlossene Hernien-Operation, Leberlebendspende
- Kein Zustand nach Transplantation
- Keine Immunosuppression
- Keine chronische Infektion (zum Beispiel mit Hepatitis B oder C)

Ausschlusskriterien:

- Fehlen der Einschlusskriterien
- Keine Einwilligung zur Studienteilnahme

7.4. Ablauf und Durchführung

In Übereinstimmung mit den Ein- und Ausschlusskriterien wurden die Studienteilnehmer direkt durch die Studienärzte angesprochen, aufgeklärt und bei Zustimmung in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden vor Studienbeginn über Nutzen und Risiken bezüglich der Studienteilnahme aufgeklärt.

Zur Gewinnung des Probenmaterials wurde bei den Patienten an zuvor definierten Zeitpunkten etwa 10 Mikroliter (μl) Kapillarblut über einen Stich in das Ohrläppchen oder die Fingerbeere entnommen und mit einem kleinen Schwamm aufgesaugt. Dieser war an einem kleinen, aus Kunststoff bestehenden Stift fixiert, einem sogenannten *Microsampler* (Mitra Sticks, Neoteryx,

Torrance, CA, USA). Die Spitze der *Microsampler* wurde im 45°-Winkel in den erzeugten Blutstropfen eingetaucht und die Aufnahme des Blutes bis zur vollständigen Rotfärbung der Spitze fortgesetzt. Die Entnahmezeitpunkte sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Blutentnahme wurde in den Morgenstunden, das heißt vor Nahrungsmittel- und Medikamenteneinnahme, durchgeführt.

Das entnommene Kapillarblut wurde als Trockenblut in *Microsamplern* im Labor der Experimentellen Chirurgie gesammelt, beschriftet, sortiert und bei Raumtemperatur gelagert, sowie anschließend zur Aufbereitung und Analyse der Metabolitprofile an *Metabolomic Discoveries GmbH* (Wissenschaftspark Golm) übermittelt. Ein Kontakt der Probenspitze mit ihrer Umgebung oder anderen Proben wurde vermieden.

Gleichzeitig wurden Patientendaten unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes pseudonymisiert in einer passwortgeschützten Datenbank an der Chirurgischen Klinik des Campus Virchow-Klinikum gespeichert und ausgewertet. Für die Korrelationsanalyse wurden zahlreiche personenbezogene Daten, darunter beispielsweise Alter, Geschlecht, LTx-Indikation, etc., aus den Patientenakten erhoben.

7.5. Technik der Lebertransplantation

Vor Beginn der eigentlichen Transplantation wird die Qualität des Spenderorgans überprüft, um eventuell ex-situ-Präparationen und -Rekonstruktionen auf einem Beistelltisch (daher *back table*-Präparation), wie zum Beispiel eine standardmäßige Cholezystektomie, durchzuführen (35). Bis zur Implantation in den Empfänger wird das Organ weiterhin auf Eis in Konservierungslösung aufbewahrt (35). Anschließend folgt die Empfängerhepatektomie über eine mediane L- oder Mercedesstern-förmige Oberbauchlaparotomie (35).

Das Spenderorgan kann je nach vorliegender Empfängeranatomie und -hämodynamik entweder orthotop oder in der *Piggy back*-Technik implantiert werden (1, 35). Der Begriff „orthotop“ leitet sich vom griechischen *orthos* (gerade) und *topos* (Ort), also „am richtigen Ort“, ab und meint die Implantation des Organs an seiner physiologischen Stelle. Bei der orthotopen Lebertransplantation werden die supra- und infrahepatische Vena cava von Spender und Empfänger jeweils in einer End-zu-End-Anastomose verbunden (35). Die hierbei notwendige Abklemmung der V. cava inferior und V. portae hepatis birgt die Gefahr hämodynamischer Komplikationen. Durch Drosselung des venösen Rückflusses kommt es zu einem Abfall des

arteriellen Blutdrucks (35). Zeitgleich besteht durch Druckanstieg in der Vena cava distal des Clamps die Gefahr eines akuten Nierenversagens, sodass ein veno-venöser Bypasses bei der OLT durchgeführt werden kann (35).

Im Gegensatz dazu wird bei der *Piggy-back*-Technik die Vena cava des Spenders auf dem Konfluens der Lebervenen des Empfängers anastomosiert, während die infrahepatische Spenderhohlevene ligiert wird (35). Ein wesentlicher Vorteil der *Piggy-back*-Technik ist sicherlich die Gewährleistung des venösen Rückflusses in der anhepatischen Phase, was eine reduzierte hämodynamische Belastung mit fehlender Notwendigkeit eines veno-venösen Bypasses ermöglicht (35). Beide Techniken sind in Komplikations- und Überlebensraten vergleichbar (35, 58). Im Anschluss an die Cava-Anastomose erfolgt die Verbindung der Venae portae mit hepatischer Reperfusion, sowie der Arteriae hepaticae (1). Es folgt die Seit-zu-Seit- oder End-zu-End-Choledochocholedochostomie von Empfänger- und Spendergallengang, wobei die Seit-zu-Seit-Anastomose bezüglich des postoperativen Galleabflusses Vorteile zu bieten scheint (35). Bei Erkrankungen der extrahepatischen Gallenwege, zum Beispiels bei Gallengangsatriesie, besteht häufig zudem die Notwendigkeit einer Choledochojejunostomie (35).

7.6. Methoden der Probenauswertung

Da zu Beginn der Probenauswertung nicht bekannt war, in welcher Konzentration und Art die Metabolite im Trockenblut vorliegen, zielte der Versuchsaufbau darauf ab, eine möglichst hohe Detektionsbreite zu erzielen. Daher erfolgte eine Kopplung flüssigkeitschromatografischer Trennung (*liquid chromatography*, kurz: *LC*) mit Ionisations(ESI-)gekoppelter massenspektrometrischer Detektion (MS).

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung eingebrachter Molekülgemische nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis. In einer Ionenquelle werden die Moleküle im ersten Schritt durch Aufbringen eines Elektrons ionisiert. Hierfür stehen eine Reihe verschiedener Ionenquellen zur Verfügung. Im Rahmen dieser Studie wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) als Molekül-schonendes Verfahren verwendet. Hierbei wird das Molekülgemisch durch eine Kapillare geleitet, an deren Spitze eine Hochspannung angelegt wird, wodurch zwischen Kapillare und Gegenelektrode ein elektrisches Feld entsteht (59). Dem elektrischen Feld folgend kommt es zur elektrophoretischen Wanderung der Ionen und

Ansammlung gleichartig geladener Ionen an der Kapillarspitze (59). Durch zunehmende Verdampfung der Trägersubstanz mit konsekutiver Reduktion des Tropfendurchmessers kommt es bei Erreichen des Rayleigh-Limits zu einem sukzessivem Zerfall in kleinere Fragmente. Der Ionisierungsprozess findet unter Atmosphärendruck statt und bringt vorwiegend deprotonierte ($[M-H]^-$) und protonierte Moleküle ($[M+H]^+$) hervor (52). Die hierbei frei werdenden Ionen werden im Anschluss dem Analysator des Massenspektrometers zugeführt, wobei auch hier verschiedene Analysatoren zur Verfügung stehen. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde zunächst die Masse-Flugzeitanalyse (*time of flight*, TOF) eingesetzt, die es ermöglicht, eng beieinander liegende Massen akkurat aufzulösen und somit die Analyse der chemischen Zusammensetzung zu erleichtern. Für diesen Schritt wurde ein hochauflösender 6540 QTOF/MS-Detektor (Agilent, Santa Clara, USA) mit einer Massengenauigkeit von $< 2 \text{ parts per million}$ (ppm) und einer Erfassungsbreite von 50 to 1700 m/z (Masse-zu-Ladung-Verhältnis) bei zwei Gigahertz (GHz) eingesetzt. Eine hohe Massengenauigkeit ist für die spätere Bestimmung der Strukturformel essentiell (52). Moleküle, die sich nur in wenigen Atomen unterscheiden, können aufgrund der endlichen Messgenauigkeit ab einer gewissen Molekülgröße nicht mehr eindeutig unterschieden werden. Daher kann es sinnvoll sein, die Moleküle vor der MS in kleinere Fragmente zu zerlegen. Masse und Ladung der Fragmente können schließlich massenspektrometrisch gemessen und mit Datenbanken abgeglichen werden. Zur Erhöhung der Spezifität erfolgte daher eine Kombination mit einem Triple-Quadrupol-MS. Das im Quadrupol Q1 herrschende Wechselfeld regt die Ionen zu oszillierenden Flugbahnen an. Da nur in bestimmten Massenbereichen die Flugbahnen der Ionen ausreichend stabil sind, können nur Teilchen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis den Quadrupol durchlaufen, der Rest wird aus der Bahn getragen (59). Die verbleibenden Moleküle werden in Q2 durch Kollision mit einem inerten Gas fragmentiert und in Q3 erneut selektiert.

Insgesamt können somit Zielsubstanzen einer heterogenen Probe zielgerichtet und reproduzierbar analysiert werden. Der Versuchsaufbau ermöglicht eine Metabolit-Analyse mit einer Weite von 50-1700 Dalton, einer Genauigkeit von bis zu ein bis zwei ppm und einer Auflösung von $\text{Masse}/\Delta\text{Masse} = 40.000$.

Bislang unbekannte Metabolite werden anhand ihrer akkuraten Masse und Verweildauer beschrieben (Masse@Verweildauer, bspw. 230.9478@3.1). Prinzipiell können in späteren

Analysen unbekannte Metabolite fragmentiert und Summenformeln generiert werden, hierauf wurde jedoch in dieser Studie verzichtet.

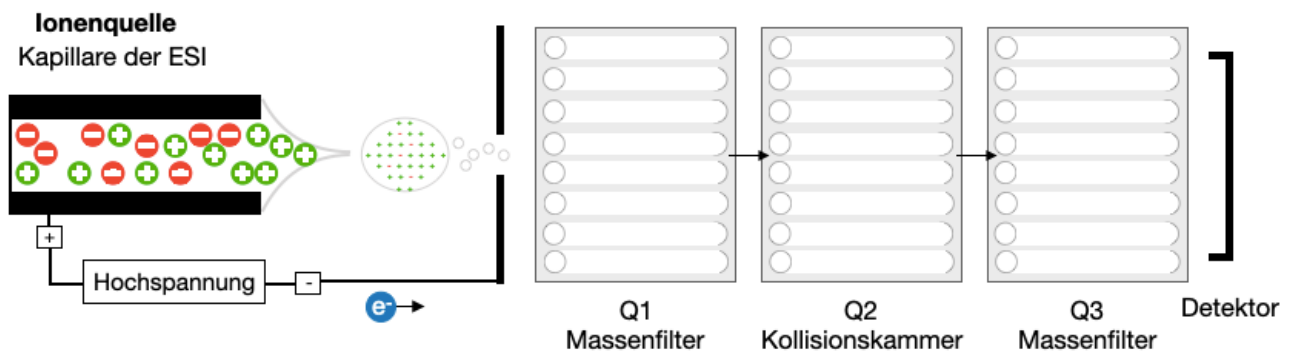


Abbildung 4: Prinzip eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit ESI-Quelle: Eigene Darstellung, in Anlehnung an (52)

Der Massenspektrometrie wird eine flüssigchromatographische Trennung vorgeschaltet, um die in der Probe enthaltenen Substanzen nach ihren chemischen Eigenschaften zu trennen und somit die anschließende MS zu erleichtern (52). Hierbei kommen in der Regel die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder die Ultra-HPLC (UHPLC) zum Einsatz (52). Bei der Chromatographie handelt es sich um eine Trennmethode zur Zerlegung von Substanzgemischen anhand ihrer Verteilung in verschiedenen Phasen. Die Testsubstanz wird dabei in einer flüssigen Phase (mobile Phase) gelöst und anschließend in eine stationäre Phase überführt (Säule). Die chromatographische Trennung kann durch Verwendung von Säulen unterschiedlicher chemischer Eigenschaften variiert werden. Bei der *reversed* Phase (RP) liegt eine unpolare stationäre und eine polare mobile Phase vor, was zur Folge hat, dass unpolare Moleküle länger in der Säule zurückgehalten und polare Stoffe leicht eluiert werden. Da der Charakter von Metaboliten in der Regel stark polar ist und die Verwendung von RP-Säulen zu einer insuffizienten Trennung führen würde, bietet sich der Einsatz sog. HILIC-Säulen an (52).

Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Trennung mithilfe der ZIC®-pHILIC-Säule (Merck Sequant, Germany, 3.5 µm Partikelgröße, 200 Å Porengröße, 100 x 2.1 mm). HILIC (hydrophile Interaktionschromatographie) zeichnet sich durch eine Verlinkung mit verschiedenen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Anionen, Kationen oder Aminogruppen, aus (52). In einem wässrigen Lösungsmittel mit hohem organischen Anteil, in der Regel Acetonitril oder Methanol, findet die Bindung des Stoffgemischs an die stationäre Phase statt (52). Durch stufenweise Erhöhung des wässrigen Anteils lassen sich die Analyten anschließend leichter aus

der Säule eluieren. Die Zwischenschaltung von Blindproben (Leerprobe, *Blanks*) und Kontrollproben dient der Qualitätskontrolle der Probenanalyse. Leerproben sind Probenmatrices, die den Analyten nicht enthalten. Sie helfen bei der Unterscheidung zwischen echten Metaboliten und etwaigen Verunreinigungen, die durch die Probenvorbereitung eventuell in die Probe geraten sein könnten (52).

Kontrollproben enthalten alle zu analysierenden Metaboliten in gleicher Art und Konzentration wie die Messproben (daher auch *pooled biological quality control*, PBQC). Zur Detektion eventueller Sensitivitätsverluste werden diese PBQC in einer festgelegten Frequenz zwischen die eigentlichen Messproben geschaltet (52).

Die Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe des *Molecular-Feature-Extraction-Tools* und der *MassHunter Qualitative Analysis B.05.00* Software (*Agilent Technologies*). Hierdurch konnten nicht brauchbare Informationen und somit ein großer Teil des Rauschens eliminiert werden.

7.7. Statistik

Im Anschluss an die Massenspektrometrie erfolgte eine statistische Auswertung. Zunächst wurden Median (\tilde{x}) und Standardabweichung (σ^2) der Metabolitkonzentrationen für die Versuchs- und Kontrollgruppen bestimmt. Zudem erfolgt ein Stichprobenmittelwertvergleich mithilfe des Welch-Tests. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Software *Mass Profiler Professional* (Agilent). Es erfolgte ein statistischer Vergleich der Metabolitkonzentrationen beziehungsweise ihrer Mittelwerte zwischen:

- Versuchsgruppe A1 vs. Versuchsgruppe A2
- Versuchsgruppe A1 vs. Kontrollkohorte B
- Versuchsgruppe A1 vs. Kontrollkohorte C

Als Hypothesentest wurde der Welch-Test (t-Test mit Welch-Korrektur) eingesetzt, da es sich um zwei voneinander unabhängige Stichproben mit Varianzheterogenität (Heteroskedastizität) handelt. Er prüft, ob zwei Grundgesamtheiten gleiche Mittelwerte aufweisen. Da die Teststatistik bei einem Welch-Test durch die Heteroskedastizität nicht t-verteilt ist, werden bei Verwendung des Welch-Tests die Freiheitsgrade approximativ bestimmt (Behrens-Fisher-Problem). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die zu prüfende Nullhypothese (H_0) lautete: eine eventuell bestehende Mittelwertsdifferenz zwischen Versuchsgruppe A1 und den

Gruppen A2, B und C ist zufällig entstanden. Die Differenz zwischen A1 und den Vergleichsgruppen ist gleich Null, sie besitzen gleiche Populationsmittelwerte.

Die Wahrscheinlichkeit des t-Werts gibt Hinweise darauf, ob die zugrundeliegende Nullhypothese zutrifft oder nicht. Sehr kleine Wahrscheinlichkeitswerte für t legen eine Ablehnung der Nullhypothese nahe - der Unterschied in den Messwerten ist vermutlich nicht durch Zufall entstanden, sondern das Vorliegen eines systematischen Effekts ist wahrscheinlicher. Ein t-Wert wurde als signifikant angesehen, wenn seine Wahrscheinlichkeit unterhalb des gewählten Signifikanzniveaus α (hier $p < 0,05$; entspricht 5 %) lag.

Für die Beschreibung der Patientenkohorte wurde zunächst eine deskriptive Statistik mit Angabe der Häufigkeiten sowie Medians angefertigt. Für den Vergleich der Kohorteneigenschaften erfolgte ein Mittelwertvergleich mithilfe des t-Tests beziehungsweise Mann-Whitney-U-Tests. Außerdem wurden mithilfe des Pearson Chi-Quadrat-Tests kategoriale Variablen korreliert. Bei einer zu erwartenden Zellenhäufigkeit von kleiner fünf wurde anstelle des Chi-Quadrat-Tests der exakte Test nach Fisher verwendet. Zuletzt wurde die Test-Performance durch Sensitivität, Spezifität und Youden-Index beurteilt und graphisch in einer ROC-Kurve dargestellt.

8. Ergebnisse

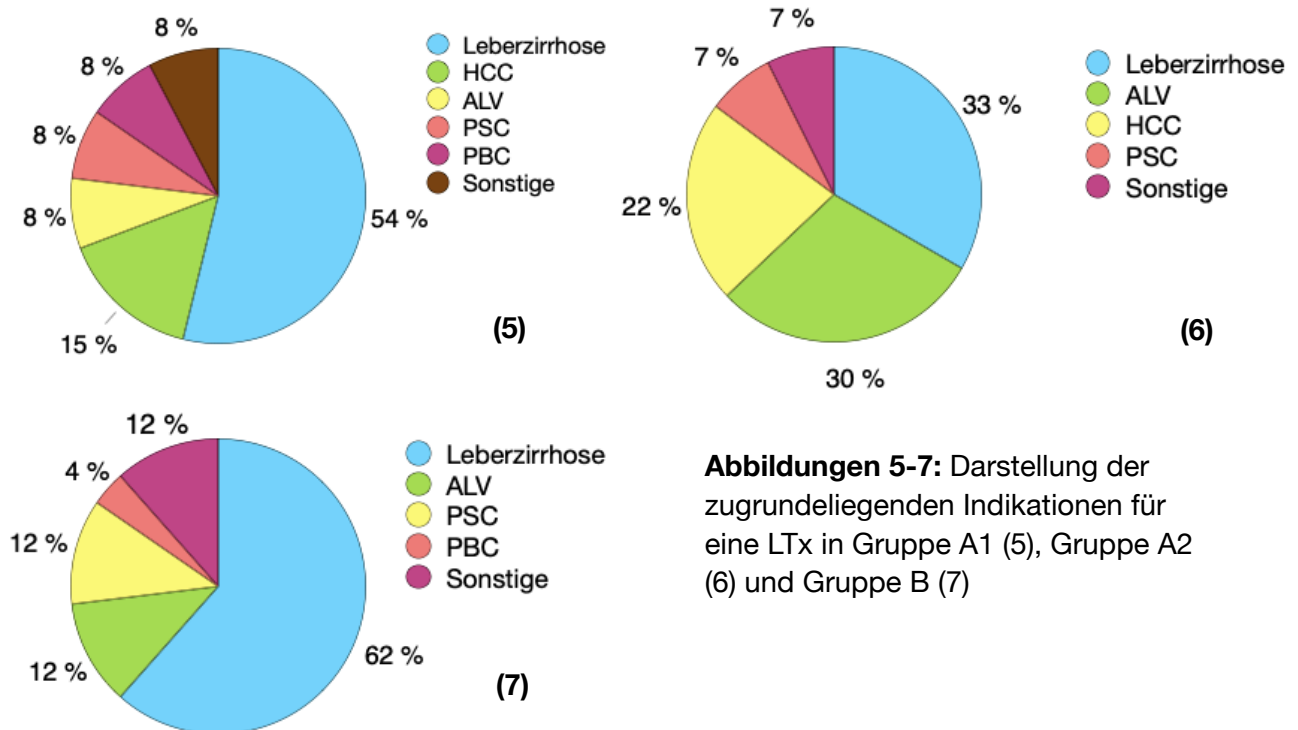
8.1. Beschreibung des Patientenkollektivs

Tabelle 2: Demographie und Studienmerkmale

Variable	Gruppe A1	Gruppe A2	p-Wert	Gruppe B	p-Wert	Gruppe C	p-Wert
Alter (Jahre)	50 ± 12	50 ± 14	0,918	48,3 ± 13	0,697	57 ± 14	0,146
Geschlecht (w/m)	3/10	6/21	0,952	8/18	0,719	12/13	0,136
Grunderkrankung							
Leberzirrhose	7	9	0,305	16	0,645	-	-
HCC	2	6	1,0	0	0,105	-	-
ALV	1	8	0,226	3	1,0	-	-
PSC	1	2	1,0	3	1,0	-	-
PBC	1	0	0,33	1	1,0	-	-
Sonstige	1	2	1,0	3	1,0	-	-
Empfängercharakteristika							
MELD-Score	21,5 ± 11	21,3 ± 12	0,887	23,4 ± 9,8	0,611	-	-
BMI (kg/m ²)	26,7 ± 2,6	26,3 ± 4,5	0,746	27 ± 4,8	0,838	-	-
Eigenschaften des Allograft							
CIT (min)	556 ± 115	566 ± 150	0,826	567 ± 125	0,807	-	-
WIT (min)	45 ± 9	46 ± 10	0,75	46 ± 8	0,946	-	-
ACR nach Banff							
mild	14	-	-	-	-	-	-
moderat	3	-	-	-	-	-	-
schwer	0	-	-	-	-	-	-

Tabelle 2 zeigt die Aufschlüsselung der demographischen und klinischen Patientendaten. Stetige Variablen sind mit dem arithmetischem Mittel sowie der Standardabweichung angegeben, im Folgenden werden sie außerdem anhand der Spannweite (*range*, R) und des Interquartilabstands (*interquartile range*, IQR) beschrieben. In der Summe wurden 81 Patienten in die Studie eingeschlossen, darunter 56 Lebertransplantierte und 25 gesunde Kontrollprobanden.

Versuchsgruppe A1 wurden 13 Patienten zugeordnet. Gruppe A2 27 Patienten und Gruppe B 26 Probanden zugeordnet.



Sowohl in der Studienkohorte, als auch in der Kontrollkohorte stellen Männer das stärker vertretene Geschlecht dar. Die Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,952$; $p = 0,136$). Die Versuchsgruppen A1 und A2 weisen einen Altersmedian von 52 ($\bar{x} = 50$, $R = 32$, $IQR = 24$, $p = 0,932$) beziehungsweise 53 Jahren ($\bar{x} = 48$, $R = 45$, $IQR = 25$) auf. Mit einem Altersmedian von 53 Jahren (Gruppe B, $\bar{x} = 57$, $R = 42$, $IQR = 23$) und 62,5 Jahren (Gruppe C, $\bar{x} = 57$, $R = 52$, $IQR = 18$) weichen die Vergleichsgruppen hiervon um wenige Jahre ab, wobei Vergleichsgruppe C im Bezug auf das Alter eine deutlich größere Schwankungsbreite aufweist. Ein Mittelwertvergleich des Alters mittels t-Test ergibt für die Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die korrespondierenden p-Werte sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Unter den zugrundeliegenden Lebererkrankungen stellt sowohl in der Versuchsgruppe A1 ($n = 7$) und A2 ($n = 9$), als auch in der Kontrollgruppe B eine Leberzirrhose die häufigste Diagnose dar ($n = 16$). Dies entspricht in Gruppe A1 einer relativen Häufigkeit von 54 %, in Gruppe A2 von 33 % und in Gruppe B von 61,5 %. Ein HCC folgte hierbei in der Versuchsgruppe A1 an zweiter

Stelle (n = 2) und in Gruppe A2 an dritter Stelle (n = 6). In Vergleichsgruppe A2 wurde bei knapp einem Drittel der Patienten die Indikation aufgrund eines akuten Leberversagens gestellt (n = 8). Unter der Kategorie „Sonstige“ werden seltene Grunderkrankungen wie die sekundär sklerosierende Cholangitis oder die autosomal-dominante polyzystische Leber- und Nierenerkrankung subsummiert. Bezüglich der Grunderkrankungen besteht zwischen den Gruppen A1 und A2 sowie A1 und B kein signifikanter Unterschied, da die p-Werte jeweils oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,5 % liegen. Die Indikationen zur Lebertransplantation sowie die relativen Häufigkeiten zeigen die Abbildungen 5 bis 7 jeweils für die Gruppen A1, A2 und B.

Die Evaluation der Transplantationsdringlichkeit erfolgte unter anderem nach dem lab-MELD-Score. In Versuchsgruppe A1 liegt der lab-MELD-Score im Durchschnitt bei 21,5 (R = 33, IQR = 12), in Gruppe A2 bei 21,3 (R = 34, IQR = 21) und in Vergleichsgruppe B bei 23,54 (R = 33, IQR = 15,5). Im Mittelwertvergleich ergibt sich zwischen Gruppen A1 und A2 (p = 0,887) beziehungsweise A1 und B (p = 0,611) kein signifikanter Unterschied.

Der BMI (*body mass index*, Körpermasseindex) bei Patienten mit ACR (A1) liegt im Durchschnitt bei 26,7 kg/m² (R = 8,96; IQR = 3,55). Gruppe A2 hat ein arithmetisches Mittel von 26,3 (R = 19,92; IQR = 6,07) und Gruppe C von 27 (R = 19,22; IQR = 6,80). Die BMI der Patienten aus Kontrollgruppe C wurden nicht dokumentiert. Der Unterschied zwischen A1 und A2 (p = 0,746) und B (p = 0,838) ist statistisch nicht signifikant.

Auch die Ischämiezeiten zeigen in Gruppe A1 und A2 nur geringe Abweichungen. Die CIT beträgt für Gruppe A1 im Mittel 556 Minuten und für Gruppe A2 566 Minuten. Die WIT (*warm ischemia time*, warme Ischämiezeit) liegt bei durchschnittlich 45 (Gruppe A1) beziehungsweise 46 Minuten (Gruppe A2). Ein Mittelwertvergleich mittels t-Test ergibt keinen signifikanten Unterschied für die CIT oder WIT. Die p-Werte betragen 0,826 (CIT) und 0,75 (WIT). In Kontrollgruppe B konnten acht Patienten keine Ischämiezeiten zugeordnet werden, unter anderem da einige der LTx kurzfristig abgesagt wurden. Bei den übrigen Patienten aus Kontrollgruppe B liegt die CIT im Median bei 567 und die WIT bei 46 Minuten. Der p-Wert liegt bei 0,807 (CIT) beziehungsweise 0,960 (WIT). Somit ist der Unterschied zur Versuchsgruppe A1 ist nicht signifikant.

Im Studienzeitraum zeigten sich in 33 der durchgeführten 147 Leberbiopsien akute Organabstoßungen. Bei 17 der Abstoßungsereignisse gelang es, eine Kapillarblutprobe zu

entnehmen und die Metabolitprofile zu untersuchen. Da bei drei der 13 Patienten im postoperativen Verlauf mehrfache Biopsien mit Nachweis einer ACR erfolgten, weicht die Anzahl der Proben ($n = 17$) von der Anzahl der Probanden ($n = 13$) in Gruppe A1 ab. Der Schweregrad der ACR wurde nach RAI graduiert. Bei 82,4 % ($n = 14$) lag eine milde Abstoßung und bei 17,6 % ($n = 3$) eine moderate Abstoßung vor.

8.2. Trockenblutanalyse

Im ersten Schritt wurde mit der in Kapitel 7.6. beschriebenen Messmethodik die Metabolitkonzentration von insgesamt 556 unterschiedlichen Molekülen innerhalb jeder vorhandenen Trockenblutprobe bestimmt. Trockenblutproben konnten nur dann eindeutig in Gruppe A1 oder A2 zugeordnet werden, wenn innerhalb weniger Tage vor oder nach Probengewinnung eine Leberbiopsie erfolgte. In Gruppe A1 lag die BE durchschnittlich einen Tag von der Leberbiopsie entfernt (Minimum = 0, Maximum = 4, Median = 1). In Gruppe A2 erfolgte die BE durchschnittlich mit einem Abstand von 1,3 Tagen von der Biopsie (Minimum = 0, Maximum = 5, Median = 1).

8.3. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Versuchsgruppe A2

Schließlich folgte eine statistische Auswertung. Im Stichprobenmittelwertvergleich zwischen Gruppe A1 und A2 lagen die p-Werte (Wahrscheinlichkeiten für die t-Werte) von 29 Metaboliten unter 0,05 (5 %) und somit innerhalb des zugrundeliegenden Signifikanzniveaus α . Es ist daher davon auszugehen, dass die Differenz der Konzentrationsmittelwerte zwischen A1 und A2 nicht durch Zufall zustande gekommen ist, sondern ein systematischer Effekt vorliegt. Die Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Im Median wiesen Patienten ohne Abstoßungsreaktion höhere und stärker um den Mittelwert streuende Purinkonzentrationen auf ($\bar{x} = 73713,438$; $\sigma^2 = 9567,81$) als Patienten mit Transplantatabstoßung ($\bar{x} = 66403,78$; $\sigma^2 = 6087,35$). Der p-Wert lag bei 0,0005 und somit innerhalb des Signifikanzniveaus.

Patienten der Versuchsgruppe A2 zeigten im Median zehnfach höhere Werte des N-Undecanoylglycin und eine deutlich höhere Standardabweichung ($\bar{x} = 5810,268$; $\sigma^2 = 14349,19$) im Vergleich zu Gruppe A1 auf ($\bar{x} = 406,65$; $\sigma^2 = 873,388$). Bezüglich (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol lagen in Gruppe A1 im Median niedrigere Konzentrationen und

eine geringere Standardabweichung vor ($\bar{x} = 1969,51$; $\sigma^2 = 854,505$) als bei Gruppe A2 ($\bar{x} = 2526,85$; $\sigma^2 = 1144,33$). Der p-Wert lag hier bei 0,04. Metabolite ohne signifikante Mittelwertdifferenz sind in Tabelle I im Anhang zu finden.

Tabelle 3: Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und A2					
Metabolite	Versuchsgruppe A1 (ACR)		Versuchsgruppe A2 (keine ACR)		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
Purine	66403,8	6087,4	73713,4	9567,8	0,0005
Iopromide	445,5	662,3	4601,3	8945,5	0,001
Lansiumamide C	130,5	224,9	614,5	1000,1	0,001
N-Carbamyl-N-2-pentylglycinamide	1027,5	700,9	2083,8	2289,7	0,004
N-Undecanoylglycine	406,7	873,4	5810,3	14349,2	0,007
Metronidazole	3284,6	9708,4	35226,1	86280,7	0,009
Asp-Asp-Gln-His	636,5	1041,5	2304,1	4274,1	0,01
Hexanoylcholine	179,5	286,8	605,9	1092,9	0,01
L-Valine	698957,6	372449,2	979201,1	426065,9	0,01
Gamma-Aminobutyric acid	4178,8	2091,7	6660,9	6596,2	0,02
Guanidovaleramide	872,0	1759,1	6100,2	15958,5	0,02
2-Pyrrolidineacetic acid	5435,8	2644,8	9092,6	9432,4	0,02
Etyl-3,7-dimethyl-8-oxoocta-2,4,6-trienoate	1438,0	2644,9	7962,7	19981,2	0,02
3,6,9,12,15,18,21-Heptaoxatetracontan-1-ol	242,4	306,9	856,1	1856,4	0,02
12-amino-dodecanoic acid	507,5	610,0	1332,3	2431,3	0,02
1-Octadecanol, 2-azido-3,4-bis(phenylmethoxy)-(2S,3S,4R)	796,6	1339,5	2727,6	5927,8	0,03
N-Hydroxy-L-Methionine	13347,9	1940,9	2942,8	4120,8	0,03
L-Proline	185772,6	84405,3	296885,0	352781,7	0,04
1-Pyrrolinium	3546,3	1480,4	5175,3	5043,0	0,04
(2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol	1969,5	854,5	2526,8	1144,3	0,04

Tiglylcarnitin	700,8	1182,4	8269,6	26782,4	0,04
1 β ,25-dihydroxy-2 β -(3-hydroxypropoxy)vitamin D3	1000,4	1705,6	3547,3	8558,4	0,04
Tripelennamine	6240,0	6823,7	10416,3	8440,3	0,046
Proline betaine	100686,5	104577,6	202743,0	324562,0	0,047
Ala-Lys-Thr-Pro	519,8	435,5	940,4	1351,1	0,049

Tabelle 4: Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und A2

Metabolite	Versuchsgruppe A1 (ACR)		Versuchsgruppe A2 (keine ACR)		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
853.8626@1.2137	345,5	500,7	2381,8	3907,4	0,0004
227.0649@0.6929	1324,3	825,6	854,0	563,4	0,04
189.1557@1.087	788,7	322,5	999,1	447,6	0,04

8.4. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Kontrollgruppe B

Eine statistisch signifikante Stichprobenmittelwertdifferenz bestand im Vergleich zwischen A1 und B bei 75 der geprüften 556 Metabolite. Die Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

Der Mittelwert der Purinkonzentrationen betrug bei Kontrollgruppe B $\bar{x} = 73626,4$ und die Standardabweichung $\sigma^2 = 14033,4$. Somit bestanden bei Patienten mit Leberfunktionsstörung im Vergleich zu Patienten mit Abstoßung (Gruppe A1: $\bar{x} = 66403,8$; $\sigma^2 = 6087,4$) höhere Purinkonzentrationen mit stärkerer Schwankung um den Mittelwert ($p = 0,032$). Bei Abstoßung war das N-Undecanoylglycin ($\bar{x} = 406,7$; $\sigma^2 = 873,4$) und das (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol im Median ($\bar{x} = 1969,5$; $\sigma^2 = 854,5$) in geringeren Konzentrationen nachweisbar als in Vergleichsgruppe B (Undecanoylglycin: $\bar{x} = 3663,1$; $\sigma^2 = 5683,2$; $p = 0,01$; (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol: $\bar{x} = 3001,3$; $\sigma^2 = 1460,6$; $p = 0,007$). Metabolite ohne signifikante Mittelwertdifferenz sind in Tabelle II im Anhang zu finden.

Tabelle 5: Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe B

Metabolite	Versuchsgruppe A1 (ACR)		Versuchsgruppe B (Leberzirrhose, ALV)		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
L-Valine	698957,6	372449,2	2053072,5	1094660,2	0,000004
Proline betaine	100686,5	104577,6	787118,9	727866,7	0,0001
2-Pyrrolidineacetic acid	5435,8	3644,8	13979,8	10170,9	0,0007
N-Carbamoyl-N~2~- pentylglycinamide	1027,5	701,0	8655,1	10223,6	0,001
carboxynorspermidine	2515,1	1887,3	5228,0	3601,3	0,003
N-(hexadecanoyl)- hexadecasping-4-enine-1- phosphoethanolamine	1388,3	811,0	683,7	454,7	0,004
1-Pyrrolidinecarboxaldehyde	32881,9	20674,1	90885,4	86653,7	0,004
N,N-dimethylacetamide	5396,5	3496,7	10654,6	7955,3	0,007
(2S,3S,4S)-5,7,9,11- Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol	1969,5	854,5	3001,3	1460,6	0,007
Tripelennamine	6240,0	6823,7	14100,1	11188,2	0,008
17-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z- eicosatetraenoic acid (17-HETE)	988,2	713,3	434,1	428,2	0,009
Destruxin B	1260,4	460,6	669,4	889,9	0,009
Robustine	914,4	2233,0	12173,0	19491,0	0,01
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	5851,6	2783,3	8645,9	3839,9	0,01
N-Undecanoylglycine	406,7	873,4	3663,1	5683,2	0,01
Lys Lys Phe Pro	2420,10	2050,8	917,9	1004,9	0,01
1-Palmitoyl-2-(5-hydroxy-8- oxo-6-octenedioyl)-sn- glycero-3- phosphatidylcholine	742,3	939,6	82,3	149,4	0,01
N-Hydroxy-L-methionine	1347,9	1940,9	10482,0	16171,0	0,01
1-5-diazabicyclononane	13711,1	7525,8	25314,8	19258,8	0,01
Actinonin	2624,9	1545,9	1505,4	907,1	0,01
Pirimicarb	2187,0	3250,0	5608,5	5182,7	0,01
Isocarboxazid	74087,5	79909,3	18170,7	40182,5	0,01
PE(19:0)	164098,3	129196,5	73250,5	68551,7	0,01

Arg-Lys-Phe-Gln	967,8	1176,0	182,7	251,0	0,01
Norbuprenorphine	915,0	415,7	598,0	343,4	0,01
Urea	240197,7	91816,2	174898,0	58327,1	0,02
Alpha-Linolenic acid	9814,1	14297,0	466,5	1118,2	0,02
5-Nonyltetrahydro-2-oxo-3-furancarboxylic acid	827,5	876,6	1719,4	1390,4	0,02
1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (n-C18:0)	2086,5	1171,7	1204,8	994,6	0,02
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	2259,9	1464,7	4039,2	3021,8	0,02
PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:1(11Z))	4742,7	1763,5	3398,7	1633,5	0,02
2,5-Dioxopiperazine	1235,6	722,8	3042,3	3436,0	0,02
Glu-Lys-Lys-Gln	1319,6	984,4	669,1	514,8	0,02
Succinimide	836,4	730,4	2133,2	2461,0	0,02
Arg-Lys-Tyr-Arg	642,4	854,5	112,1	147,9	0,02
4-Hydroxyproline	1321,1	1236,7	2764,4	2595,0	0,02
Felodipine	29652,9	64707,6	159118,1	254227,9	0,02
PC methyl(16:0)	1091,7	787,6	566,8	527,4	0,02
1-Pyrrolinium	3546,3	1480,4	6427,9	5799,2	0,03
9-Hydroxyoctadecadienoic acid	1752,6	1512,8	816,1	774,9	0,03
α-methyl-glutamate	4837,6	5225,4	9422,7	7691,5	0,03
[ST hydrox] (25R)-3alpha,7alpha-dihydroxy-5beta-cholestan-27-oyl taurine	5415,2	4198,6	2780,9	2404,6	0,03
guanidinocaproate	1085,3	1172,2	388,5	413,8	0,03
L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid	8123,1	6284,5	13247,0	8285,4	0,03
Beta-Carboline	7662,1	5890,2	15067,3	14443,6	0,03
Purine	66403,8	6087,4	73626,4	14033,4	0,03
Gamma-Aminobutyric acid	4179,8	2091,7	6235,2	3805,9	0,03
[DG(8:0/8:0)] 1-(8-[5]-ladderane-octanyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerol	1015,9	856,1	514,4	380,7	0,03
Compound VII	1418,5	4425,1	19255,5	38927,5	0,04

O-butanoyl-carnitine	16283,0	16185,6	7070,8	6408,2	0,04
Hexanoylcholine	179,45	286,8	548,2	762,4	0,04
Glycerol triundecanoate	480,9	286,7	725,4	453,4	0,04
L-Proline	185772,6	84405,3	354367,3	372328,8	0,04
METHYL (-)-SHIKIMATE	12034,5	18223,2	2255,5	3593,3	0,04
LysoPC(18:0)	14326,2	8102,1	9532,4	5485,1	0,04
Ile-Leu-Tyr	516,4	692,5	142,4	222,6	0,045
1-Pyrimidinylpiperazine	12021,7	3342,9	14621,9	4730,6	0,046
Cidofovir	317,6	194,9	497,8	362,7	0,047
Ile-Leu-Tyr	792,9	402,4	518,1	450,6	0,048
Felodipine	190147,0	185115,34	75129,1	163690,4	0,048
1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (n-C18:0)	17380,3	10184,1	11636,2	6088,0	0,049
2,5-Dioxopiperazine	1105,2	704,6	714,8	375,2	0,049
[ST hydrox] (25R)-3alpha,7alpha-dihydroxy-5beta-cholestan-27-oyl taurine	5857,1	7393,4	1791,5	3724,7	0,049

Tabelle 6: Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und B

Metabolite	Versuchsgruppe A1 (ACR)		Versuchsgruppe A2 (keine ACR)		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
161.1163@0.7294	6880,6	5139,3	20246,7	12265,1	0,00004
189.1557@1.087	788,7	322,5	1231,1	544,5	0,002
241.6354@2.1155	2184,8	770,2	2981,5	972,6	0,006
124.0998@2.359	2502,5	2105,7	8604,0	10178,5	0,008
72.0327@0.7691	2274,9	1613,8	1112,7	699,4	0,01
179.9281@0.822	1418,5	849,0	2154,8	974,0	0,01
683.2043@3.279	5175,9	2264,2	3518,8	1914,3	0,02
195.1187@1.145	3331,5	2399,3	5334,0	3005,1	0,02
206.1518@2.2096	5434,9	3466,9	9533,58	7895,4	0,03
399.2813@2.3754	603,9	397,4	357,4	267,6	0,03

244.2155@3.7467	551,8	569,6	217,3	295,3	0,04
144.1009@1.195	10038,8	5389,1	16545,2	13456,0	0,04

8.5. Ergebnisse beim Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Kontrollgruppe C

Die 206 Metaboliten mit signifikanter Mittelwertdifferenz im Vergleich zwischen A1 und C sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt. Patienten mit ACR weisen im Vergleich zu Gesunden geringere Purinkonzentrationen auf ($p = 0,04$). Der Mittelwert liegt in Gruppe A1 bei $\bar{x} = 66403,8$ ($\sigma^2 = 6087,4$) und in Gruppe C bei $\bar{x} = 72054,3$ ($\sigma^2 = 11230,5$). Auch die N-Undecanoylglycin-Konzentrationen sind bei Patienten ohne ACR höher ($p = 0,04$). Sie liegen bei ACR (A1) bei durchschnittlich 406,7 ($\sigma^2 = 873,4$) und bei gesunden Patienten bei 2480,1 ($\sigma^2 = 4876,8$). In Versuchsgruppe A1 lag die Konzentration von (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol im Mittel bei $\bar{x} = 1969,5$ ($\sigma^2 = 854,5$) und in Gruppe C bei $\bar{x} = 2642,2$ ($\sigma^2 = 526,4$). Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,008$). Metabolite ohne signifikante Mittelwertdifferenz sind in Tabelle III im Anhang zu finden.

Tabelle 7: Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe C					
Metabolite	Versuchsgruppe A1		Versuchsgruppe C		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
D-Erythroascorbic acid 1'-a-D-xylopyranoside	1339,1	535,2	2501,8	935,1	0,00001
Ile-His	930,6	269,7	528,0	184,4	0,00001
Cidofovir	317,6	194,9	860,8	542,8	0,00003
7-(Methylthio)heptanenitrile	14125,4	4155,5	8621,9	2735,6	0,00006
Creatinine	928542,3	365877,9	526408,8	153522,0	0,0004
Gln-Lys-Lys-His	770,1	492,6	236,0	145,7	0,0004
2-(3-Hydroxypropoxy)-propan-1-ol	9703,8	8733,8	20870,1	10113,3	0,0004
[PC (16:1)] 1-(9E-hexadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	12558,9	8136,8	3880,2	1962,5	0,0006
Urea	240197,7	91816,2	144946,8	35804,8	0,0006
Arg-Met-Gly-Pro	1329,8	1164,9	157,5	224,2	0,0008

N-acetylphospho- phosphonoacetyl-L-ornithine	4845,6	3748,5	1082,6	1036,5	0,0008
Biliverdin	10402,8	9497,3	964,0	462,1	0,0008
Asp-Trp-Val-Tyr	684,7	601,0	89,0	103,1	0,0009
L-Hexanoylcarnitine	2441,9	2054,4	420,1	511,9	0,0009
1,3-Bis(2,3,5- trihydroxyphenyl)propane-1,3- dione	2694,1	2001,8	743,7	249,3	0,001
Lys Lys Phe Pro	2420,1	2050,8	440,9	618,1	0,001
N-ETHYLMETHACRYLAMIDE	59017,3	81357,7	167792,3	127658,6	0,001
L-2-Amino-3- methylenehexanoic acid	8123,1	6284,5	2151,6	1808,4	0,001
[FA oxo,hydroxy(5:1/5:0)] (1S,2R)-3-oxo-2-(5'- hydroxy-2'Z-pentenyl)- cyclopentaneacetic acid	48593,7	37951,4	13528,3	8101,2	0,002
Calcidiol	14812,8	8419,1	7097,1	2370,2	0,002
Glycerol 1-(9Z-octadecenoate) 2-tetradecanoate 3-phosphate	1662,9	1149,6	574,3	691,5	0,002
Uridine	1956,4	1374,3	713,5	327,6	0,002
Camoensine	2634,1	1320,6	1412,7	681,9	0,002
guanidinocaproate	1085,3	1172,2	34,9	73,6	0,002
Ethyl aconitate	3379,3	1811,5	1614,3	1446,0	0,002
Adenosine	190147,0	185115,4	23954,9	56893,2	0,002
Salmeterol	3231,5	1452,3	1698,5	1588,2	0,002
Leucyl-Alanine	42253,0	35565,2	10992,5	5861,5	0,002
9-Hydroxyoctadecadienoic acid	1752,6	1512,8	423,9	553,8	0,003
2-(Ethylsulfonylmethyl)phenyl methylcarbamate	2749,5	1256,4	1622,3	677,8	0,003
12,20-Dioxo-leukotriene B4	967,0	833,3	238,5	289,9	0,003
3-Dehydroxycarnitine	96338,1	51770,5	51460,2	18775,4	0,003
Mannitol	17034,4	14890,9	4273,6	3148,1	0,003
PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/ 22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1338,5	514,7	867,0	395,0	0,003
N-acetyl-tryptophanamide	928488,1	994470,7	92226,1	227531,3	0,003
Guanosine	1131,1	1315,6	38,8	99,6	0,003

L-Methionine	972,2	1029,6	116,3	236,1	0,004
2-amino-2-deoxy-isochorismate	3842,5	2164,8	2067,2	693,6	0,004
PC(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/ 20:2(11Z,14Z))	8332,6	4337,6	4779,8	1588,2	0,004
L-Cysteine, N-acetyl-S-(2-oxopropyl)	1211,9	1080,6	343,9	185,4	0,005
Guanosine, 2'-deoxy-8-((4,6-dimethyldipyrido(1,2-a:3',2'-d)imidazol-3-yl)amino)	242,3	168,9	102,5	83,9	0,005
O-butanoyl-carnitine	16283,0	16185,6	3197,5	4806,9	0,005
Methylguanidine	3692,1	4166,6	359,7	309,9	0,005
Lactosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1245,6	880,7	537,6	265,3	0,005
Ile-Pro	43978,3	38100,4	13959,1	4524,0	0,005
Adenosine monophosphate	2059,4	1160,8	1140,8	402,7	0,005
Epinephrine	8206,5	6216,1	3357,3	1022,8	0,006
Prop-2-en-1-yl 4-(2-tert-butylhydrazinylidene)-pentanoate	4027,4	7646,1	12186,2	11106,4	0,006
2-O-Benzoyl-D-glucose	2774,0	1382,6	1699,7	485,3	0,006
N-Methylethanolaminium phosphate	55801,8	7677,3	62236,9	6094,6	0,007
Pyroglutamic acid	12184,0	8871,8	5429,0	3736,8	0,008
(2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol	1969,5	854,5	2642,2	526,4	0,008
(2S,4R)-4-(9H-Pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-1,2,4-butanetriol	1171,8	1015,6	419,2	208,6	0,008
PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/ 22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	2874,5	1693,1	1601,2	656,4	0,008
L-Carnitine	1521298,5	965805,0	808955,5	241044,4	0,008
Isocarboxazid	74087,5	79909,3	13658,0	39966,7	0,009
Biperiden	3831,3	1741,3	2447,2	1317,0	0,009
Bis(2-furanylmethyl) disulfide	3608,2	1123,0	2624,8	1273,3	0,01
N-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-L-serine	1660,5	1023,1	916,9	508,9	0,01
Arg-Lys-Phe-Gln	967,8	1176,0	152,2	242,6	0,01
PC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/ 20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	2347,5	1290,5	1429,1	603,7	0,01

Histidinyl-Proline	653,1	671,8	187,9	194,8	0,01
2-Acetyl-3-methylpyrazine	7049,2	5647,4	3152,6	1618,4	0,01
Glycerophosphocholine	44560,4	31893,4	22215,6	13422,0	0,01
5-Deoxyribose-1-phosphate	1158,2	930,1	497,9	467,3	0,01
Glyceric acid	5684,3	7644,0	565,5	550,3	0,01
2,3-dichloromaleylacetate	12300,2	5313,0	8628,6	2431,0	0,01
N-Butyl-beta-carboline-3-carboxylate	2356,0	3370,1	5993,2	6097,8	0,01
Arg-Lys-Lys-His	1167,9	1057,5	447,9	422,5	0,01
PE(17:0)	3678,5	1983,4	2301,9	1041,7	0,02
1-Palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxo-6-octenediyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	742,3	939,6	119,9	192,3	0,02
1-5-diazabicyclononane	13711,1	7525,8	8551,3	3657,3	0,02
N-(2-hydroxytetracosanoyl)-4,8-sphingadienine	615,2	310,5	376,0	288,7	0,02
17-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid (17-HETE)	988,2	713,3	419,3	737,0	0,02
Ile-Leu-Arg-His	2145,6	2312,2	623,8	396,9	0,02
Creatine	789372,0	429289,6	499566,2	182008,9	0,02
Vitisidin A	12184,8	16324,7	1499,0	3801,4	0,02
L-Glutamic acid	1095,1	849,4	517,5	449,4	0,02
2-(m-Chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	2807,3	999,2	2133,1	499,3	0,02
Pindolol	7957,3	4081,7	5245,5	1731,8	0,02
(-)-Tortuosamine	1054,8	604,5	652,0	272,2	0,02
PC(16:0/9:0(CHO))	6151,2	3425,3	3802,8	2194,6	0,02
SM(d18:1/24:0)	666,7	366,4	408,9	279,6	0,02
alpha-D-Mannoheptulopyranose	1820,6	1535,8	2887,0	1114,6	0,02
1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (n-C18:0)	2086,5	1171,7	1325,0	522,9	0,02
paspalate	5857,1	7393,4	1190,5	1598,0	0,02
(Cyclohexylmethyl)pyrazine	16822,2	6336,9	12502,4	4340,1	0,02

PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/ P-18:1(11Z))	4742,7	1763,5	3585,6	959,6	0,02
LysoPC(18:1(11Z))	30238,9	25862,0	13807,2	9681,9	0,02
D-Sedoheptulose 7-phosphate	2849,2	1483,2	1848,1	1019,9	0,02
PC (40:5)	2883,9	1405,8	1976,4	742,6	0,02
Cytochalasin Opho	774,6	785,2	282,9	277,1	0,02
11-amino-undecanoic acid	3481,6	6031,6	9618,7	11129,9	0,02
L-Lysine	928,7	946,2	1543,3	542,6	0,02
259.8268@0.622	5577,3	1054,7	4854,5	830,3	0,02
Prolyl-Alanine	3758,5	3389,3	1597,5	1709,8	0,02
Glu-Cys-Cys	5411,9	6147,4	1401,1	3983,5	0,02
α -monofluoromethylagmatine	4608,0	3013,9	6718,5	2688,8	0,02
L-Phenylalanine	14071,2	8118,5	9130,4	2694,7	0,03
Lansiumamide A	40952,6	54795,8	7120,8	26559,8	0,03
Ala-Phe-Val-Gly	474,3	432,1	212,4	168,1	0,03
2,3-Dihydroxy-2,4- cyclopentadien-1-one	946,3	648,5	537,1	390,3	0,03
Chamazulene	886,0	1310,4	108,6	306,5	0,03
Lindheimerine	6380,3	2295,3	4864,4	1772,7	0,03
(2R,3R,4R)-2-Amino-4- hydroxy-3-methylpentanoic acid	1069,9	848,7	548,8	413,9	0,03
Narciclasine	1824,2	789,2	1254,1	840,9	0,03
Asp-Asp-Gln-His	636,5	1041,6	30,9	42,9	0,03
2,4-Dinitrophenol	4262,3	2841,9	2554,7	1189,6	0,03
METHYL (-)-SHIKIMATE	12034,5	18223,2	1445,3	2109,5	0,03
Ile-Leu-Lys-Tyr	2432,1	2189,5	1151,1	769,0	0,03
D-glutaminamide	4059,7	4403,6	1469,4	1922,0	0,03
L-Acetylcarnitine	686586,8	495960,1	399045,3	190285,8	0,03
Glycylprolylhydroxyproline	2579,0	5515,1	7933,1	10677,0	0,03
Ondansetron	1895,0	2721,2	324,0	1079,3	0,03
PS(13:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	2570,6	4546,5	48,6	56,6	0,04

Purine	66403,8	6087,4	72054,3	11230,5	0,04
Arg-Lys-Phe-Arg	4933,9	8803,4	69,9	76,4	0,04
LysoPC(18:0)	14326,2	8102,1	9468,2	5268,2	0,04
Strobamine	1006,2	1185,9	336,1	439,2	0,04
Palonosetron	8346,2	4257,5	5904,0	2003,3	0,04
Arg-Tyr-Arg-Arg	4400,0	7968,1	33,6	45,3	0,04
N-Methylaspidospermatidine	18169,1	9792,3	12226,8	6978,7	0,04
N-Hexadecanoylpyrrolidine	3476,9	2649,4	1931,6	1516,9	0,04
PE(22:1(13Z)/15:0)	42044,3	39167,3	19167,2	22887,5	0,04
N-Undecanoylglycine	406,7	873,4	2480,1	4876,8	0,04
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	2259,9	1464,7	1306,0	1404,7	0,04
PE(19:0)	164098,3	129196,5	89953,3	73177,1	0,04
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	5851,6	2783,3	4189,3	2005,1	0,04
14,19-Didehydrocondyfolan	485513,1	371808,1	274005,7	208382,7	0,04
Iopromide	445,5	662,3	94,2	18,6	0,04
Cholesta-3,5-dien-7-one	788,8	453,5	516,6	351,1	0,04
TG(14:0/15:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	3597,2	1999,3	2375,5	1668,2	0,04
D-erythro-L-galacto-Nonulose	1242,8	730,0	822,2	486,1	0,046
N-Desalkyl flurazepam	5744,1	3029,3	3967,6	2211,3	0,046
Ala-Phe-Pro-Arg	1256,6	2306,6	51,9	110,9	0,047
[ST hydrox] (25R)-3alpha,7alpha-dihydroxy-5beta-cholestan-27-oyl taurine	5415,2	4198,6	3106,8	2155,6	0,048
Thr-Cys-Pro	5400,3	9129,0	669,1	878,4	0,049
3-O-(beta-D-glucopyranosyl)-campest-5-en-3beta-ol	1110,9	670,8	718,7	512,8	0,049
4-carboxy-2-hydroxypenta-2,4-dienoate	1778,5	950,4	1216,9	758,9	0,049
Propionylcarnitine	78225,1	58852,1	46692,1	24186,1	0,049
Inosine	9107,7	6566,2	5173,1	5555,6	0,049
4-(Dodecylsulfanyl)-4-oxobutanoic acid	2842,5	5869,7	7788,8	10345,8	0,049

Tabelle 8: Unbekannte Metabolite mit statistisch signifikanter Mittelwertsdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und C					
Metabolite	Versuchsgruppe A1 (ACR)		Versuchsgruppe A2 (keine ACR)		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
519.5002@3.0198	1267,1	332,5	788,9	255,3	0,00002
179.8881@0.8065	1928,1	1474,4	5133,7	3583,3	0,0002
160.8769@0.7887	604,0	385,7	1123,1	548,9	0,0007
258.8269@0.6057	78601,3	10224,9	67588,0	8331,8	0,0008
194.9581@0.8272	1074,2	813,4	2162,3	1191,5	0,0008
256.83@0.6057	77314,1	9945,9	66779,6	8117,0	0,001
260.8238@0.6063	28312,8	3861,9	24302,7	3015,0	0,001
179.9281@0.822	1418,5	849,0	3351,3	2610,3	0,001
174.0405@0.9534	2799,1	2511,2	430,2	412,4	0,001
979.9826@0.7939	6418,8	5248,2	13381,8	8246,0	0,001
244.7626@0.5969	652,3	299,4	969,2	287,2	0,001
245.075@0.6907	6816,5	6052,5	1252,2	1600,0	0,002
940.1541@3.0642	7850,6	2602,0	5048,3	3122,6	0,003
242.7654@0.5969	941,3	473,8	1401,8	446,4	0,003
907.6177@2.8142	2167,4	1216,6	1109,4	568,5	0,003
115.0738@1.2627	5292,9	2233,6	3394,7	1219,6	0,004
72.0327@0.7691	2274,9	1613,8	979,4	477,2	0,005
469.9029@1.0137	1348,4	299,1	1051,2	372,4	0,006
202.8097@0.5802	86296,4	5779,0	80421,0	7709,4	0,006
257.8298@0.6299	5598,5	812,8	4928,6	609,8	0,007
635.4159@3.0221	2325,3	1497,9	1164,2	797,1	0,008
93.9353@0.5636	5370,1	1356,9	4335,7	681,3	0,008
58.9837@0.793	10389,6	7789,9	17806,7	10043,7	0,009
124.0998@2.359	2502,5	2105,7	965,8	669,8	0,009
749.4002@3.5227	730,7	612,1	255,1	416,0	0,009
158.8795@0.7887	4145,4	2061,8	6010,7	2642,6	0,01

241.6354@2.1155	2184,8	770,2	1654,0	320,7	0,01
157.9568@0.9599	11179,4	3636,7	8626,8	1918,9	0,01
254.8348@0.6302	4645,6	778,2	4074,7	580,7	0,01
201.8128@0.5802	8892,6	711,5	8248,8	970,6	0,02
661.5996@3.014	768,6	368,6	516,2	174,8	0,02
89.9697@0.9622	57822,3	20188,8	44179,6	9611,0	0,02
240.768@0.5969	609,2	377,5	883,7	301,4	0,02
243.0722@0.6888	4253,9	1964,9	2948,7	864,6	0,02
683.2043@3.279	5175,9	2264,2	3592,2	1615,4	0,02
156.8819@0.797	5158,5	2575,4	7197,6	2939,0	0,02
633.8681@0.9514	1326,7	509,9	997,1	235,0	0,02
333.9289@1.0303	1694,2	514,1	1344,6	366,9	0,02
227.0649@0.6929	1324,3	825,6	1913,7	768,6	0,02
594.4876@2.7625	643,7	341,9	378,6	408,9	0,03
180.8485@0.6052	6958,9	1171,6	6179,2	908,7	0,03
175.1221@1.3509	9640,7	5804,4	5844,6	4374,0	0,03
196.819@0.5802	764958,1	61072,0	718093,1	76069,5	0,03
249.0477@1.2139	870,6	405,6	611,6	306,7	0,03
565.8809@0.9513	1386,4	432,1	1125,4	235,1	0,03
583.8516@1.9516	2532,7	4337,7	76,8	66,2	0,03
671.4026@2.0311	2664,4	4681,0	32,4	24,5	0,03
693.9174@2.0467	2731,9	4750,4	69,6	60,3	0,03
583.35@1.9515	3394,7	6065,2	40,0	51,2	0,04
737.9435@2.0769	1767,7	3102,8	52,3	60,2	0,04
715.9305@2.0625	2397,2	4182,2	85,5	63,0	0,04
194.823@0.5802	39319,0	3018,3	37071,7	3911,3	0,04
759.4549@2.0927	1984,5	3440,5	103,7	53,3	0,04
182.8453@0.6051	5193,2	1275,5	4457,0	672,3	0,04
262.8207@0.614	4717,1	902,5	4180,6	589,0	0,04
222.1468@1.5928	3133,4	2123,7	4823,8	3172,1	0,04

693.4156@2.0512	4188,0	7639,9	64,0	73,3	0,04
561.8385@1.936	1997,7	3473,7	123,6	141,2	0,04
737.4418@2.0812	1477,0	2743,7	11,2	20,4	0,04
526.655@2.1094	1318,8	2384,1	52,6	54,9	0,04
520.5006@3.0243	289,7	211,1	165,3	152,0	0,04
385.942@0.997	1899,1	645,7	1514,0	492,8	0,04
627.3764@1.996	3542,9	6733,3	22,8	14,2	0,047
568.3559@2.9308	365,8	377,3	164,9	135,5	0,049

8.6. Schlussfolgerungen

In Zusammenschau der Ergebnisse fällt auf, dass die Konzentrationsmittelwerte bei drei der 556 Metabolite in allen Vergleichsgruppen (A1 vs A2, A1 vs B, A1 vs C) statistisch signifikante Unterschiede aufweisen. Bei diesen drei Metaboliten handelt es sich um Purin, N-Undecanoylglycin und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol. Die Abbildungen 8 bis 10 stellen die Kastendiagramme (*Box-Plots*) der identifizierten Metabolite dar.

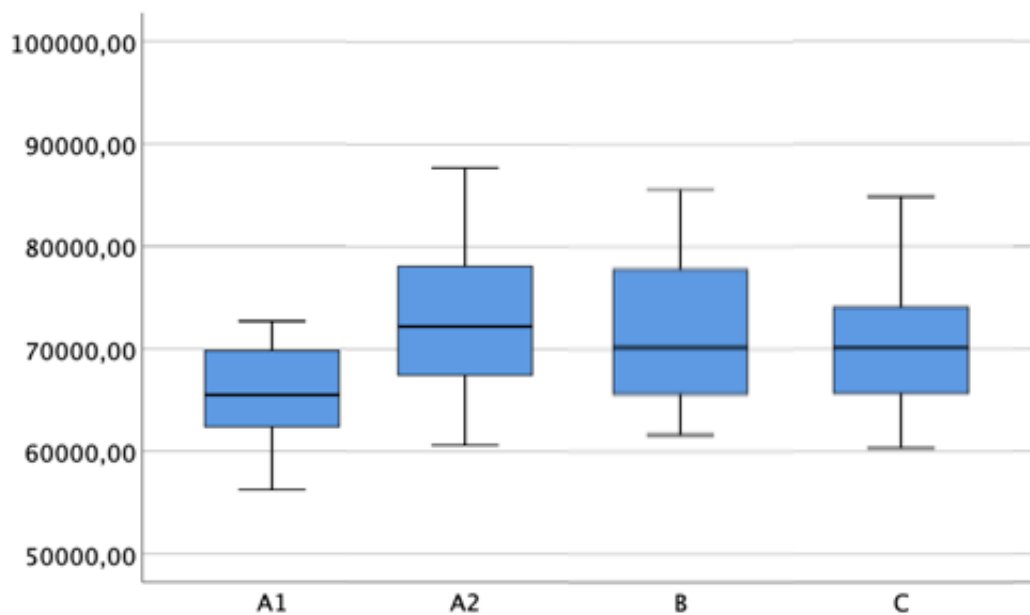


Abbildung 8: *Box-Plot* zur Darstellung der Verteilung von Purin

Dass Patienten mit ACR geringere Purinkonzentrationen aufweisen, als die Kontrollgruppen, wird in Abbildung 8 graphisch verdeutlicht. Versuchsgruppe A1 hat einen Median von 65498,9, eine IQR von 7790,4, ein Minimum von 56249,2 und ein Maximum von 81078,4. In

Versuchsgruppe A2 liegt der Median bei 72215,8, die IQR bei 10788,2 sowie das Minimum bei 60617,2 und Maximum bei 99206,6. Bei Patienten mit Leberfunktionsstörung (Gruppe B) liegt die Purinkonzentration im Median bei 70157,4 (IQR = 13426,3; Minimum = 61622,4; Maximum = 129824,3). Gesunde Patienten (Gruppe C) haben im Median Purinwerte von 70122,5 (IQR = 9030,3; Minimum = 60335,2; Maximum = 109474,8).

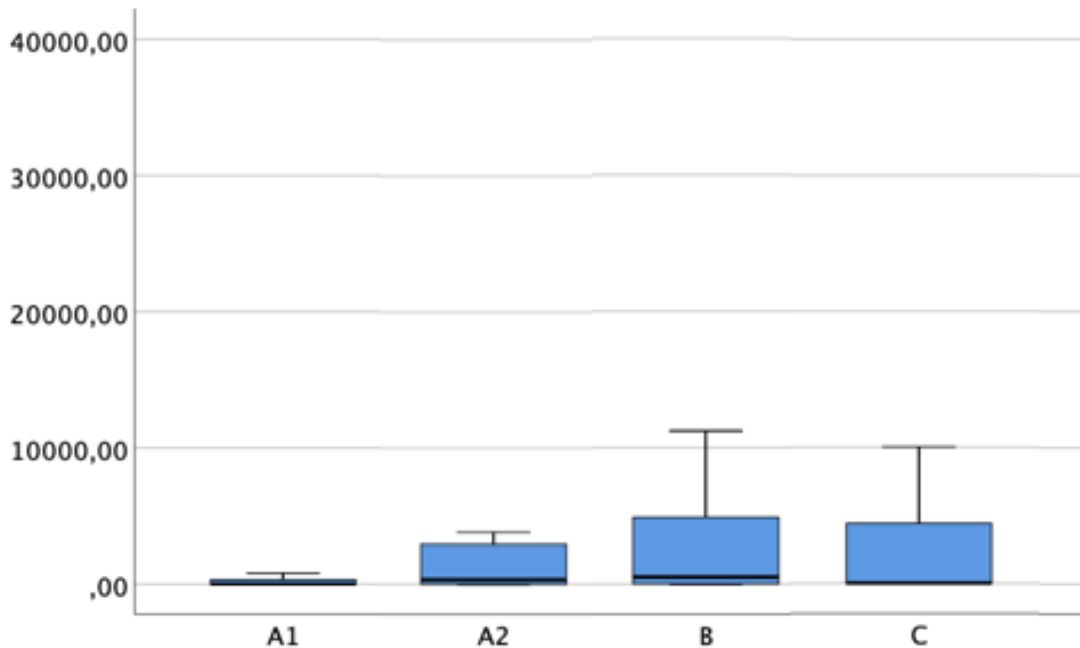


Abbildung 9: Box-Plot zur Darstellung der Verteilung von N-Undecanoylglycin

Die Verteilung der N-Undecanoylglycin-Konzentration bei Patienten mit ACR (A1) zeigt einen Median von 6,39, eine IQR von 641,6, ein Minimum von 0,59 und ein Maximum von 2981,0. Einen ähnlichen Median weisen gesunde Patienten (C) auf (Median = 6,4; IQR = 4405,2; Minimum = 4,11; Maximum = 19572,5). Der Unterschied zwischen Gruppe A1 und C ist dennoch statistisch signifikant ($p = 0,04$). Studienkohorte A2 hat im Bezug auf die N-Undecanoylglycin-Konzentration einen Median von 312,9, eine IQR von 2927,9, ein Minimum von 0,44 und ein Maximum von 60352,5. Bei Kontrollgruppe B liegt der Median bei 507,6 (IQR = 4959,4; Minimum = 0,59; Maximum = 22913,1).

(2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol ist bei Patienten mit ACR in geringerer Konzentration in Trockenblutproben nachweisbar als bei den Vergleichsgruppen. Die Lagemaße lauten Median = 1749,8; IQR = 910,3; Minimum = 321,6 und Maximum = 3900,6. In Vergleichsgruppe A2 liegt der Median 2665,8 mit einer IQR von 1657,4, einem Minimum von 1053,8 und einem Maximum von 5546,5. Gruppe B weist mit 2973,4 den höchsten Median auf

(IQR = 1441,8; Minimum = 1306,6; Maximum = 7057,1). In Gruppe C liegt er bei 2509,9; die Spannungsweise beträgt 860,3, das Minimum 1332,6 und das Maximum 3186,2.

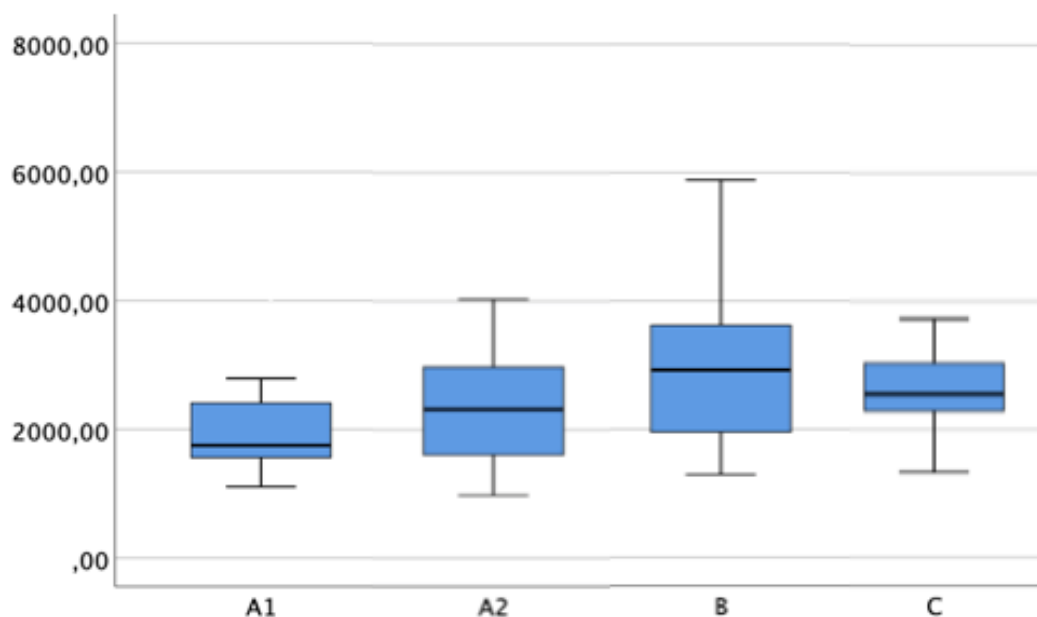


Abbildung 10: Box-Plot zur Darstellung der Verteilung von (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol

8.7. Beurteilung der Test-Performance

Zur Beurteilung der diagnostischen Qualität und somit Aussagekraft der identifizierten Biomarker wurde mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Ehningen, Deutschland) eine ROC-Kurve erstellt. Diese ist in Abbildung 11 dargestellt.

ROC-Analysen werden verwendet, um durch die Auftragung verschiedener *Cut-Off*-Werte (Schwellenwert) einer Prädiktorvariable die *Performance* eines diagnostischen Tests zu beurteilen. Hierbei werden für die verschiedenen *Cut-Offs* Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und Falsch-Positiv-Rate berechnet und in der Kurve dargestellt.

Als objektiver Maßstab wurde zur Identifikation des optimalen *Cut-Offs* für die Biomarker der Youden-Index angewandt. Der Index kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei höhere Werte eine bessere *Performance* des Tests nahelegen. Tabelle 9 zeigt den Youden-Index für Purin, N-Undecanoylglycin und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol. Der Schwellenwert mit dem höchsten Youden-Index liegt für Purin bei 63516,10, für N-Undecanoylglycin bei 23,40 und für (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol bei 1947,10. Purin besitzt als Biomarker den höchsten Youden-Index von 0,42. Der Youden-Index von N-Undecanoylglycin beträgt 0,3 und für (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol

bei 0,33. Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Güte eines diagnostischen Tests ist die Betrachtung der so genannten *area under the curve* (AUC, Fläche unter der ROC-Kurve). Je größer die Fläche, desto besser ist die Klassifizierungsfähigkeit und somit Qualität des diagnostischen Tests. Die Fläche beträgt bei Purin 0,767, bei N-Undecanoylglycin 0,670 und für (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol 0,630. Eine Einordnung der Ergebnisse findet in Kapitel 9.2.3. statt.

Tabelle 9: Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der ACR-Diagnostik durch Biomarker

	Purine	N-Undecanoylglycin	Tridecatetrayne
Cut-Off-Wert	63516,10	23,40	1947,10
Spezifität, %	47	73	67
Sensitivität, %	96	57	66
Youden-Index	0,42	0,30	0,33

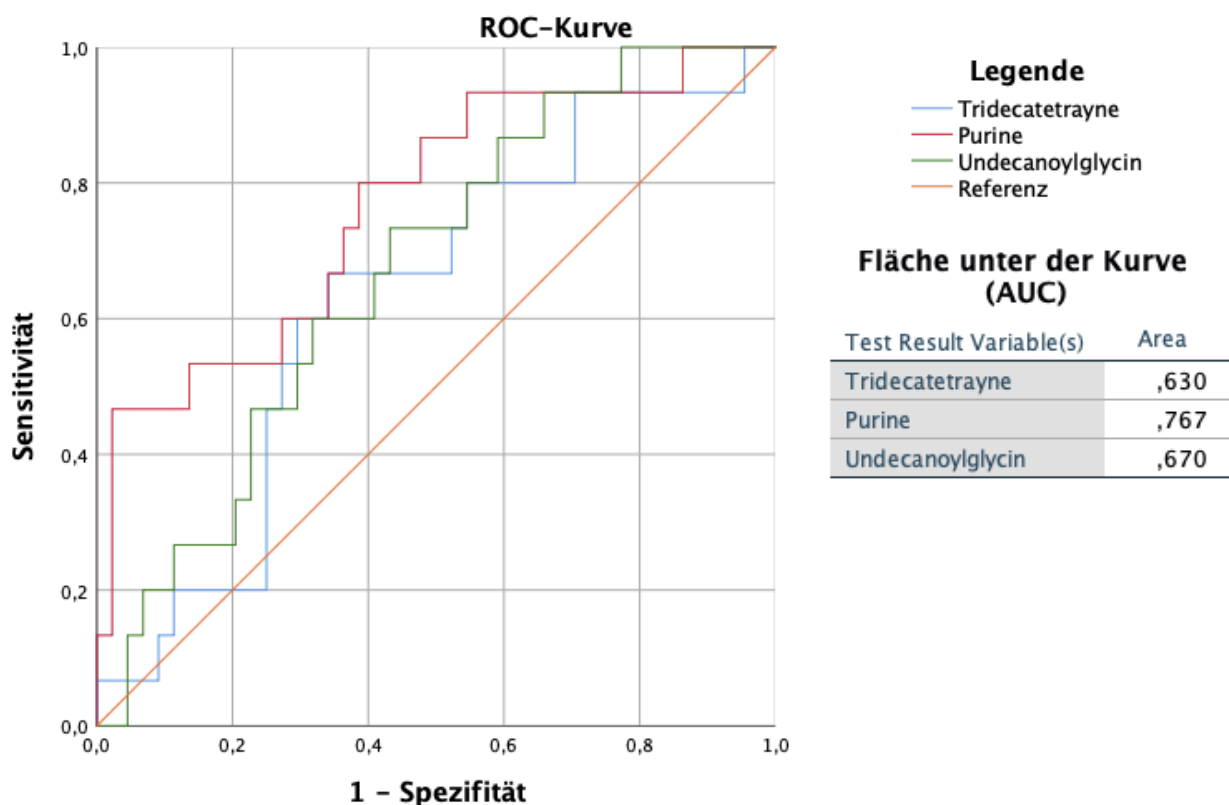


Abbildung 11: Receiver-Operating-Characteristic-Kurve zur Unterscheidung zwischen Patienten mit ACR (A1) und Patienten mit bioptischem Ausschluss einer ACR (A2) durch für Purin, N-Undecanoylglycin und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol.

9. Diskussion

9.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Mit der Observationsstudie wurde erstmals eine massenspektrometrische Metabolitanalyse aus getrockneten Kapillarblutproben durchgeführt und die Metabolitprofile auf Vorliegen von Biomarkern für die Diagnose einer akuten zellulären Rejektion geprüft. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Metaboloms lebertransplantierte Patienten mit Identifikation diagnostischer Parameter für eine histologisch gesicherte ACR. Die vergleichende Analyse von Blutproben der Gruppe A1 und A2 diente der Identifizierung von signifikanten Metabolitdifferenzen, die womöglich als hinweisend für eine ACR gewertet werden können. Hierbei wurden insgesamt drei Metabolite, darunter N-Undecanoylglycin, Purin und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol, als potenzielle Biomarker für eine ACR identifiziert, die zu den Kontrollgruppen einen hochsignifikanten statistischen Unterschied aufwiesen.

9.2. Diskussion der Methodik

Trockenblutproben bieten den Vorteil einer minimal-invasiven, schnell verfügbaren und einfach transportierbaren Patientenprobe. Zusätzlich ist die Entnahme in der Häuslichkeit durch medizinische Laien, z. B. durch Patienten selbst, möglich. Gleichzeitig geht die Verwendung von Trockenblut mit einigen Restriktionen einher (55). Zwar erfolgte die Gewinnung der Trockenblutproben anhand klinikinterner Standards (sog. *Standard operating procedures*, SOP), dennoch muss bereits in der präanalytischen Phase mit möglichen Artefakten gerechnet werden. Hierzu zählen unter anderem Variationen bei der Wahl des Entnahmeortes, der Einstichtiefe, des applizierten Gewebedrucks sowie der Luft- und Lichtexposition während der Probentrocknung (55). Da eine schnelle Probentrocknung und eine niedrige Luftfeuchte zu einer Verbesserung der Probenstabilität führt, erfolgte die Trocknung der Microsampler in entsprechenden Trocknungsvorrichtungen unter Licht- und Feuchtigkeitsschutz durch Verwendung von Silikagel. Die Stabilität variiert je nach Analyt zwischen einigen Tagen, Monaten (Pharmazeutika, Nukleinsäuren) und mehreren Jahren, letztes trifft insbesondere auf Vitamine zu (55). Die für diese Studie gewonnenen Trockenblutproben wurden über einen Zeitraum von mehr als 14 Monaten gesammelt. Massenspektrometrische Analysen fanden an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten statt, sodass sich die Dauer der Probenlagerung jeweils im Maximalfall auf mehrere

Monate belief. Trotz der bedarfsgerechten Lagerung der Proben sind lagerungs- und zeitbedingte Veränderungen und somit eine Verfälschung des Gesamtergebnisses nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Durch die geringe Probengröße (< 50 µl Fassungsvermögen der Mikrosamplern) und in der Regel niedrige Konzentration der Ziel-Analyten, könnte ein *Assay* mit hoher Sensitivität und Spezifität die Testschärfe erhöhen (55). Dieser Problematik wurde durch Wahl eines Versuchsaufbaus begegnet, der eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität ermöglicht. Da zu Beginn der Studie nicht bekannt war, nach welchen Zielsubstanzen gesucht wird, sollten die Analyseschritte darauf ausgelegt werden, eine möglichst hohe Detektionsbreite und -genauigkeit zu erzielen. Diese zielgerichtete Detektion unbekannter Messgrößen aus einer unbekanntem, biologisch komplexen Probe wurde durch das von Metabolomic Discoveries entwickelte Verfahren gewährleistet.

9.2.1. Assay Bias und Abhilfemaßnahmen

In der Trockenblutanalytik stellt das so genannte Hämatokrit-Problem die am häufigsten diskutierte Problematik dar (60). Der Hämatokrit beeinflusst die Viskosität des Blutes und somit seine Verteilung entlang der Filterpapierkarte, sodass die von den Karten entnommenen Stanzen beachtliche Variationen des Hämatokrit aufweisen können (60). Je höher der Hämatokrit, desto geringer die Verteilung des Blutes und der darin enthaltenen Analyten entlang des Filterpapiers. Auf diese Weise enthalten Stanzen, die von einem Hämatokrit-armen Areal der Filterpapierkarte entnommen werden, weniger Blut und geringere Konzentrationen des Ziel-Analyten. Durch die ungleichmäßige Analytenverteilung können die Stanzen in der Konsequenz keine repräsentativen Analytkonzentrationen ergeben, was zu einer Ergebnisverzerrung im Sinne eines *Assay Bias* führt (55). Um das Hämatokrit-Problem zu überwinden, wurden bereits zahlreiche Abhilfemaßnahmen entwickelt, wobei im Rahmen dieser Studie das sog. *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS) eingesetzt wurde. VAMS-Samplern bestehen aus einem Plastikstift, an dessen Spitze sich ein saugfähiges Polymermaterial befindet, das über Kapillarwirkung ein vorgegebenes Blutvolumen aufnimmt (61). Es handelt sich um eine Alternative zur klassischen Trockenblutprobe (*dried blood sample*, DBS), die ein vorgegebenes Blutvolumen absorbiert und in Folge dessen geringere Hämatokritschwankungen und eine geringere Inter-Sample-Variabilität aufweist (61). Sobald das Polymer eine vollständige Rotfärbung aufweist, ist die Probe maximal

gefüllt und die Probengewinnung abgeschlossen, was das VAMS zu einem einfachen und selbstanzeigenden *Tool* macht (57). Anders als bei der DBS, die nach der Entnahme den Proben transfer auf eine geeignete Filterpapierkarte mit anschließender Trocknung notwendig macht, ist die Materialgewinnung bei der VAMS mit vollendeter Blutabnahme abgeschlossen. Somit kann der Prozess der Probengewinnung bei Verwendung von VAMS deutlich verkürzt, vereinfacht und mögliche Fehlerquellen ausgeschaltet werden (61).

9.2.2. Qualitätsbeurteilung Biomarker

Eine Qualitätsbeurteilung der Metaboliten für den Einsatz als Biomarker kann mithilfe der in Kapitel 6.3.3. genannten Qualitätskriterien erfolgen. Hierbei wurden folgende fünf Kriterien genannt: 1) Sensitivität, Spezifität und *Receiver-Operating-Characteristic*-Kurve, 2) Abgrenzbarkeit von anderen Pathologien, 3) Messung mittels effizienter, leicht verfügbarer Testverfahren, 4) Etablierung an einer ausreichend großen Studienpopulation und 5) unabhängige Validierung des Biomarkers (2). Durch den Abgleich der Metabolitprofile mit denen der Vergleichsgruppen ist eine ausreichende Abgrenzbarkeit von anderen Pathologien gewährleistet. Die LC-MS stellt nicht nur eine objektive, sondern auch effektive Messmethode dar und wird dank der Weiterentwicklung moderner Hochdurchsatztechnologien zunehmend leichter verfügbar. Dennoch handelt es sich um eine sehr zeit- und kostenaufwändige Messmethode, sodass die Etablierung von *Assays* zur gezielten Metabolitbestimmung eine attraktive Option darstellt. Eine Validierung der Biomarker bleibt zunächst offen und ist im Rahmen weiterer Studien zu überprüfen. Eine Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und ROC-Kurve erfolgte in Kapitel 8.7.

9.2.3. Diagnostische Güte aus statistischer Sicht

Der Youden-Index ist ein rechnerisches Maß zur Identifizierung des optimalen Schwellenwerts und berechnet sich aus der Summe von Spezifität und Sensitivität minus eins. Dabei gilt derjenige Schwellenwert als der Beste, der den höchsten Index aufweist, ohne dass dabei das Verhältnis aus Sensitivität zu Spezifität berücksichtigt wird. In der Konsequenz bedeutet dies, dass nicht zwischen den Klassifikationsfehlern unterschieden wird. So würde ein Test mit einer Sensitivität von 0,8 und einer Spezifität von 0,3 denselben Index ergeben wie ein Test mit einer Sensitivität von 0,3 und einer Spezifität von 0,8. Die Wahl des optimalen Schwellenwertes ist

insofern im Wesentlichen von seinem Anwendungsgebiet abhängig. Ist es entscheidend, eine möglichst hohe Zahl Kranker als solche zu identifizieren, so erfolgt dies meist durch Wahl eines Grenzwertes mit hoher Sensitivität unter Inkaufnahme einer hohen Falsch-Positiv-Rate. Im Rahmen der ACR-Diagnostik ist eine hohe Falsch-Negativ-Rate insofern ungünstig, da akute Rejektionen übersehen und Patienten in der Konsequenz nicht einer potenziell lebensrettenden Therapie überführt werden könnten. Daher sollte der Cut-Off so gewählt werden, dass eine Unterscheidung zwischen „ACR“ und "keine ACR“ mit hoher Sensitivität, ggf. zu Lasten der Spezifität, erfolgt. Patienten könnten im zweiten Schritt einem Bestätigungstest unterzogen werden, um falsch positiv Getestete zu identifizieren.

Mandrekar et al. zufolge suggeriert ein AUC-Wert zwischen 0,7 und 0,8 eine akzeptable, zwischen 0,8 und 0,9 eine exzellente und ein Wert von über 0,9 eine herausragende Abgrenzbarkeit (62). Ein Wert nahe 0,5 kommt einer Generierung der Variablen durch Zufallsprinzip gleich und weist auf eine fehlende Diskriminationsfähigkeit des Tests hin. Purin besitzt eine AUC von 0,767, N-Undecanoylglycin von 0,670 und (2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol von 0,630. Folgt man der Einschätzung von Mandrekar et al., so handelt es sich bei der Biomarker-Bestimmung um zufriedenstellende diagnostische Tests. Purine weisen dabei die höchste diagnostische Güte auf.

9.2.4. Einschränkungen aus Sicht des Studiendesigns

Entsprechend dem in Kapitel 7.4. beschriebenen Studienprotokoll erfolgte bei den Probanden an vorgegebenen perioperativen Zeitpunkten eine kapilläre Blutentnahme. Bei Verdacht auf ACR wurde außerdem Kapillarblut entnommen. Aufgrund der klinischen Vielgestaltigkeit einer akuten Abstoßungsreaktion und der fehlenden klinischen Abgrenzbarkeit von anderen postoperativen Komplikationen war zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Zuordnung der Patientenprobe in Versuchsgruppe A1 oder A2 möglich. Erst durch eine Leberbiopsie ließ sich eine ACR histopathologisch als solche identifizieren und eine Einordnung der Probe erfolgte ex post. Aus dem Umstand, dass Leberbiopsien sehr zurückhaltend und nur bei begründetem klinischen Verdacht eingesetzt werden, ergibt sich, dass eine deutlich höhere Zahl an Trockenblutproben als an Biopsaten vorlag.

Der Physiker Erwin Schrödinger beschrieb 1935 sein Gedankenexperiment „Schrödingers Katze“. In dem Experiment postuliert Schrödinger, dass man ohne Verifizierung von außen nicht

unterscheiden könne, ob sich die Katze in einem lebendigen oder toten Zustand befinde. Dieses Phänomen der „kohärenten Überlagerung“ bezeichnete er als „Katzenzustand“.

Einem solchen Katzenzustand begegnet man auch bei der Einordnung der Trockenblutproben. In Anlehnung an das Gedankenexperiment ließen sich Trockenblutproben ohne korrespondierende Leberbiopsie nicht eindeutig als „ACR“ versus „keine ACR“ einordnen. Um eine Verfälschung der Studienergebnisse zu vermeiden, wurden diese Proben somit nicht bei der Auswertung berücksichtigt, sodass die Anzahl der effektiv zur Verfügung stehenden Blutproben deutlich minimiert wurde.

Beim Vergleich der Versuchsgruppen A1 und A2 ist ferner zu berücksichtigen, dass es sich bei den Patienten aus Gruppe A2 nicht um gesunde Probanden handelt. Vielmehr erfolgt hierbei ein Vergleich der Metabolitmuster bei Abstoßungsreaktion und derer bei andersgearteten postoperativen Transplantatfunktionsstörungen.

9.2.5. Einschränkungen aus Sicht der Statistik

Da die Form der t-Verteilung vom Stichprobenumfang abhängig ist, ergeben sich bei kleineren Stichprobenumfängen flachere und schmalgipfligere t-Verteilungen. Die Auftretenswahrscheinlichkeit für einen bestimmten t-Wert entspricht der Fläche unter der Kurve, die durch Integration der t-Verteilung ermittelt wird. Somit erhöht sich bei flacherem Kurvenverlauf die Fläche und die Auftretenswahrscheinlichkeit. Das bedeutet, dass bei kleinen Stichproben eine empirische Mittelwertsdifferenz mit höherer Wahrscheinlichkeit auftritt, auch wenn die zugrundeliegende Population identisch ist beziehungsweise die zugrundeliegenden Populationen identische Mittelwerte aufweisen. In der Konsequenz bedeutet dies, dass je kleiner der Stichprobenumfang ist, desto ungenauer die Schätzung der Populationsparameter anhand der Stichprobenwerte. Insofern ist die gegebene Teilnehmerzahl innerhalb der Studiengruppen (z. B. 17 analysierte Proben in Versuchsgruppe A) bei der Beurteilung der Aussagekraft der Ergebnisse zu berücksichtigen.

9.3. Diskussion der Ergebnisse

Bei N-Undecanoylglycin handelt es sich um einen bislang kaum beschriebenen Metaboliten aus der Gruppe der Acylglycine beziehungsweise Fettsäureamide. Fettsäureamide entstehen durch Reaktion von Fettsäuren mit Aminoalkoholen. Es findet Erwähnung in dem von Liu et al. 2015

publizierten Paper über den Effekt von Wirkstoffen der traditionell chinesischen Medizin auf humane Hepatozyten (63). Auch in dieser Studie bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in den Metabolitprofilen der Medikamenten-exponierten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (63). Interessanterweise konnten hierbei verschiedene Metabolite der Fettsäureoxidation, darunter N-Undecanoylglycin, als Biomarker für die medikamentös-induzierte Hepatotoxizität der eingesetzten Wirkstoffe identifiziert werden (63). Darüber hinaus findet N-Undecanoylglycin bislang keine nennenswerte Erwähnung in vorhandenen Publikationen. Betrachtet man die Ergebnisse der durch Liu et al. durchgeführten Studie gemeinsam mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist davon auszugehen, dass N-Undecanoylglycin mit einer Schädigung der Leber assoziiert ist.

(2S,3S,4S)-5,7,9,11-Tridecatetrayne-1,2,3,4-tetrol gehört zur Gruppe der ungesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffe und ist beim Menschen in der Zellmembran lokalisiert. Aufgrund seiner vier Hydroxygruppen wird es als Tetrol den Polyolen, das heißt den mehrwertigen Alkoholen, zugeordnet. Genauer gesagt befinden sich diese Hydroxygruppen am fünften, siebten, neunten und elften Kohlenstoffatom. Ein Zusammenhang zu Erkrankungen der Leber oder zur ACR ist bislang nicht beschrieben worden.

Purin stellt neben Pyrimidin den wichtigsten Grundbaustein der Nucleinsäuren dar. Als bipyridische Verbindung besteht es aus den beiden Heterozyklen Pyrimidin und Imidazol. Im menschlichen Organismus kommt es innerhalb der Nucleinsäuren Adenin und Guanin vor. Der Purin-Abbau beginnt mit Abspaltung der Phosphatreste durch sogenannte Nucleotidasen. Hierbei entstehendes Inosin und Guanosin werden durch die Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP) phosphorolytisch in ihre Hauptbestandteile Zucker und freie Basen gespalten. Die Basen wiederum können entweder über einen *Salvage-Pathway* wiederverwendet oder in Harnsäure umgewandelt und renal eliminiert werden.

Wie diese Studie zeigt, korreliert die serologische Purinkonzentration mit dem Auftreten einer akuten zellulären Rejektion. Die Purinkonzentrationen der von Abstoßung betroffenen Patienten lagen im Median unterhalb derer nicht betroffener Patienten. Dies ließ sich ebenfalls im Vergleich zu den beiden Gruppen B und C nachweisen, bei denen ebenfalls im Median höhere Purinkonzentrationen und höhere Abweichungen um den Mittelwert bestanden.

Studien legen nahe, dass die Purin-Nucleosid-Phosphorylase (PNP), die am Abbau der Purinbasen beteiligt ist, als Biomarker mit dem Ausmaß hepatozellulärer Schädigung korreliert.

Beispielsweise stellten Mischinger et al. im Tierversuch fest, dass erhöhte PNP-Konzentrationen das Ausmaß von Konservierungsschäden (*preservation injury*) und somit die Wahrscheinlichkeit des Transplantatüberlebens abbilden können (64). Als vorwiegend im Zytoplasma von hepatischen Endothel- und Kupfferzellen lokalisiertes Enzym scheint es durch reaktive Sauerstoffspezies im Zusammenhang eines Reperfusionsschadens freigesetzt zu werden (64). Eine Bestimmung serologischer PNP-Konzentrationen erfolgte in der Metabolomanalyse dieser Studie nicht, weshalb letztlich ungeklärt bleibt, ob bei Patienten mit bioptisch gesicherter Rejektion ebenfalls erhöhte Serumkonzentrationen bestanden. Es ist jedoch denkbar, dass eine womöglich bestehende Konzentrationserhöhung des PNP für die signifikant niedrigeren Purinkonzentrationen bei ACR verantwortlich gemacht werden können. Um zu beurteilen, ob und inwieweit Purin und PNP pathogenetisch mit der akuten zellulären Rejektion im Zusammenhang stehen, ist weitere Forschung notwendig.

9.4. Abschließende Zusammenfassung

Klinisch wird der Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion derzeit auf Basis klinischer und laborchemischer Parameter erhoben und muss schließlich bioptisch gesichert werden. Biomarker, mit deren Hilfe eine Abstoßungsreaktion eindeutig von anderen Transplantataffektionen unterschieden werden kann, fehlen. Diese Studie erbrachte die Korrelation dreier Metabolite mit einer akuten zellulären Rejektion, wobei die Funktion der detektierten Metabolite und ihre Bedeutung für die Pathogenese einer ACR unklar bleibt. Zusammenfassend ist eine Eignung der ermittelten drei Biomarker für die Diagnostik einer akuten zellulären Rejektion denkbar, erfordert jedoch weitere klinische Erprobung.

9.5. Ausblick

Die Eignung der identifizierten Biomarker zur Diagnostik einer ACR sollte in weiteren prospektiven Studien geprüft werden. Zufriedenstellende Ergebnisse dieser Studien vorausgesetzt, könnte schließlich eruiert werden, ob eine Translation in einen *Point-of-Care-Test* (POCT) möglich ist. Die Vorteile einer POCT-Technologie lägen dabei in der schnellen, gerätearmen und standortnahen Probenanalyse, die auf eine Probenaufbereitung durch ein Labor verzichtet. Ähnlich wie bei der Blutzuckerselbstmessung wäre in der Konsequenz eine eigenständige Entnahme durch den Patienten, die minimal-invasiv durch einen Stich in die

Fingerbeere erfolgt, perspektivisch möglich. Der Einsatz der minimal-invasiven Blutabnahme könnte somit ein engeres Monitoring des Transplantats ermöglichen, das frühzeitig zur Erkennung von Komplikationen und einer akuten Abstoßungsreaktionen führen kann. Mögliche Vorteile sind die Förderung der Patientencompliance und eine bessere Kontrolle der Leberfunktion, was eine Erhöhung der Überlebensrate und eine Entlastung des Gesundheitssystems ermöglichen kann. Zudem ist eine Translation auf andere Patientenkollektive grundsätzlich denkbar (z. B. Patienten nach Nierentransplantation).

Literaturverzeichnis

1. Mehrabi A, Fonouni H, Muller SA, Schmidt J. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today. *Langenbeck's archives of surgery* 2008;393:245-60.
2. Verhelst XP, Troisi RI, Colle I, Geerts A, van Vlierberghe H. Biomarkers for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplant recipients: A review. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2013;43:165-78.
3. I.M Sauer WOB, P. Neuhaus. Liver transplantation. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Zuckerschwerdt Verlag: René G. Holzheimer, John A. Mannick; 2001.
4. Aberg F, Isoniemi H, Hockerstedt K. Long-term results of liver transplantation. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society* 2011;100:14-21.
5. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America* 2010;90:643-53.
6. Lowe MC, D'Angelica MI. Anatomy of Hepatic Resectional Surgery. *The Surgical clinics of North America* 2016;96:183-95.
7. Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology* 1999;30:1339-46.
8. Graziadei I, Zoller H, Fickert P, Schneeberger S, Finkenstedt A, Peck-Radosavljevic M, Muller H, Kohl C, Sperner-Unterweger B, Eschertzhuber S, Hofer H, Ofner D, Tilg H, Vogel W, Trauner M, Berlakovich G. Indications for liver transplantation in adults : Recommendations of the Austrian Society for Gastroenterology and Hepatology (OGGH) in cooperation with the Austrian Society for Transplantation, Transfusion and Genetics (ATX). *Wiener klinische Wochenschrift* 2016;128:679-90.
9. Primary Diseases Leading to LT in Europe. (Accessed 06.03.2018, at <http://www.eltr.org/Overall-indication-and-results.html>.)
10. Detlef Schuppan NHA. Liver Cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-51.
11. Ge PS, Runyon BA. Treatment of Patients with Cirrhosis. *The New England journal of medicine* 2016;375:767-77.
12. Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, Gao B, Gual A, Lackner C, Mathurin P, Mueller S, Szabo G, Tsukamoto H. Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:16.

13. Shah NL, Banaei YP, Hojnowski KL, Cornella SL. Management options in decompensated cirrhosis. *Hepatic medicine : evidence and research* 2015;7:43-50.
14. Johannes Wiegand TB. The Etiology, Diagnosis and Prevention of Liver Cirrhosis. *Deutsches Ärzteblatt International* 2013;110:85-91.
15. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology* 1987;7:660-4.
16. Nusrat S, Khan MS, Fazili J, Madhoun MF. Cirrhosis and its complications: evidence based treatment. *World journal of gastroenterology* 2014;20:5442-60.
17. Gines A, Escorsell A, Gines P, Salo J, Jimenez W, Inglada L, Navasa M, Claria J, Rimola A, Arroyo V. Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology* 1993;105:229-36.
18. T. Berg W-OB, A.R. Müller, P. Neuhaus, U. Hopf. Lebertransplantation. *Internist* 1998;39:1237-45.
19. Roderburg C, Tacke F, Trautwein C. Antiviral Therapy in Patients with Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Indications and Prognosis. *Visceral medicine* 2016;32:121-6.
20. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122:1609-19.
21. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2005;7:26-34.
22. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-17.
23. Belghiti J, Kianmanesh R. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2005;7:42-9.
24. Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Niehues SM, Seehofer D, Neuhaus P. The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2010;12:139-46.
25. Pavel MC, Fuster J. Expansion of the hepatocellular carcinoma Milan criteria in liver transplantation: Future directions. *World journal of gastroenterology* 2018;24:3626-36.

26. Xu X, Lu D, Ling Q, Wei X, Wu J, Zhou L, Yan S, Wu L, Geng L, Ke Q, Gao F, Tu Z, Wang W, Zhang M, Shen Y, Xie H, Jiang W, Wang H, Zheng S. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria. *Gut* 2016;65:1035-41.
27. W. Ray Kim TMT, Joanne T. Benson, Walter K. Kremers, Charles B. Rosen, Gregory J. Gores, E. Rolland Dickson. Deaths on the liver transplant waiting list: An analysis of competing risks. *Hepatology* 2006;43:345-51.
28. William Bernal MD, and Julia Wendon, M.B., Ch.B. Acute Liver Failure. *The New England journal of medicine* 2013;369:2525-34.
29. Ali Canbay FT, Johannes Hadem, Christian Trautwein, Guido Gerken, Michael P. Manns. Acute Liver Failure—a Life-Threatening Disease. *Deutsches Ärzteblatt International* 2011;108:714-20.
30. Kumar A, Tripathi A, Jain S. Extracorporeal bioartificial liver for treating acute liver diseases. *The journal of extra-corporeal technology* 2011;43:195-206.
31. Freeman RB, Jr., Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L, Unos/Optn Liver Disease Severity Score UOL, Intestine, Committees UOPT. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002;8:851-8.
32. Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. (Accessed 06.03.2018, at www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/RiliOrgaLeber20130308.pdf.)
33. Gastaca M. Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplantation proceedings* 2009;41:975-9.
34. Nadalin S, Bockhorn M, Malago M, Valentin-Gamazo C, Frilling A, Broelsch CE. Living donor liver transplantation. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2006;8:10-21.
35. Schmidt J, Muller SA, Mehrabi A, Schemmer P, Buchler MW. [Orthotopic liver transplantation. Techniques and results]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen* 2008;79:112-20.
36. Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Therapeutic drug monitoring* 1995;17:681-4.

37. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012. (Accessed 29.06.2019, at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304334/pdf/Bookshelf_NBK304334.pdf.)
38. Hoskova L, Malek I, Kopkan L, Kautzner J. Pathophysiological mechanisms of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and arterial hypertension. *Physiological research* 2017;66:167-80.
39. Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 2010;10:571-81.
40. Itri JN, Heller MT, Tublin ME. Hepatic transplantation: postoperative complications. *Abdom Imaging* 2013;38:1300-33.
41. Pascher A, Neuhaus P. Bile duct complications after liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2005;18:627-42.
42. Chen Hao XJ, Shen Baiyong, Deng Xiaxing, Tao Ran, Peng Chenghong, Li Hongwei. Initial Poor Graft Dysfunction and Primary Graft Non-Function After Orthotopic Liver Transplantation. *Liver Biopsy in Modern Medicine* 2011.
43. Moreno R, Berenguer M. Post-liver transplantation medical complications. *Annals of hepatology* 2006;5:77-85.
44. Wang YC, Wu TJ, Wu TH, Lee CF, Chou HS, Chan KM, Lee WC. The risk factors to predict acute rejection in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2012;44:526-8.
45. Terminology for hepatic allograft rejection. International Working Party. *Hepatology* 1995;22:648-54.
46. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997;25:658-63.
47. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric nephrology* 2010;25:61-74.
48. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology* 2011;140:51-64.
49. Gould DS, Auchincloss H, Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunology today* 1999;20:77-82.

50. Kumar S, Mohapatra N, Borle DP, Choudhury A, Sarin S, Gupta E. Non invasive diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation - Current opinion. *Transplant immunology* 2018;47:1-9.
51. Sarwal MM. Deconvoluting the 'omics' for organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation* 2009;14:544-51.
52. Stallmach A. VM. *Mikrobiom: De Gruyter*; 2016.
53. Bingol K. Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/MS. *NMR Methods. High-throughput* 2018;7.
54. Christians U, Klawitter J, Klawitter J. Biomarkers in Transplantation--Proteomics and Metabolomics. *Therapeutic drug monitoring* 2016;38 Suppl 1:S70-4.
55. Zakaria R, Allen KJ, Koplun JJ, Roche P, Greaves RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *Ejifcc* 2016;27:288-317.
56. Wilson I. Global metabolic profiling (metabonomics/metabolomics) using dried blood spots: advantages and pitfalls. *Bioanalysis* 2011;3.
57. Spooner N, Denniff P, Michielsen L, De Vries R, Ji QC, Arnold ME, Woods K, Woolf EJ, Xu Y, Boutet V, Zane P, Kushon S, Rudge JB. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* 2015;7:653-9.
58. Nikeghbalian S, Toutouni MN, Salahi H, Aliakbarian M, Malekhosseini SA. A comparative study of the classic and piggyback techniques for orthotopic liver transplantation. *Electronic physician* 2014;6:741-6.
59. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003;24:3-12.
60. De Kesel PM, Capiou S, Lambert WE, Stove CP. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis* 2014;6:1871-4.
61. Denniff P, Spooner N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Analytical chemistry* 2014;86:8489-95.
62. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol* 2010;5:1315-6.

63. Liu X, Liu Y, Cheng M, Xiao H. Metabolomic Responses of Human Hepatocytes to Emodin, Aristolochic Acid, and Triptolide: Chemicals Purified from Traditional Chinese Medicines. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2015;29:533-43.
64. Mischinger HJ, Rao PN, Todo S, Snyder JT, Quehenberger F, Murase N, Starzl TE. Levels of purine nucleoside phosphorylase (PNP) as a viability marker of nonparenchymal cells in cold preserved livers. *Transplantation proceedings* 1991;23:222-5.

Anhang

1. Metabolite ohne statistisch signifikante Mittelwertdifferenz

1.1. Vergleich von Versuchsgruppe A1 mit Versuchsgruppe A2

Tabelle I: Metabolite ohne statistisch signifikante Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und A2					
Metabolite	Versuchsgruppe A1		Versuchsgruppe A2		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
Glycylprolylhydroxyproline	2579,0	5515,1	6350,7	10775,5	0,06
Glu-Cys-Cys	5411,9	6147,4	9561,8	12246,6	0,07
[FA dioxo(8:0)] 4,7-dioxo-octanoic acid	27856,9	18791,5	37956,2	21174,1	0,07
N-ETHYLMETHACRYLAMIDE	59017,3	81357,7	103752,7	101890,3	0,07
179.9281@0.822	1418,5	849,0	1912,3	1276,4	0,07
D-glutaminamide	4059,7	4403,6	9432,1	20540,7	0,07
N-(2-Hydroxyethyl)-morpholine N-oxide	566,0	1211,5	6016,0	22937,0	0,08
2-Hydroxybutyric acid	6054,5	5178,3	8953,3	8129,7	0,09
PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	662,8	305,1	859,8	651,5	0,09
Pirimicarb	2187,0	3250,0	3874,7	4268,5	0,09
161.1163@0.7294	6880,6	5139,3	9293,7	4855,4	0,10
261.8238@0.6302	1841,5	332,6	2005,9	394,4	0,10
Arg-Thr-Arg-Arg	564,0	833,9	1617,3	4464,0	0,10
Fetidine	677,7	558,9	426,6	428,8	0,10
13-HDoHE	2542,9	3195,3	23434,9	95822,9	0,11
2alpha-Methyl-17beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-5alpha-androstan-3-one	461,0	647,9	2651,8	10045,7	0,11
Vitamin A	2091,8	3309,0	8199,9	27859,6	0,12
Triricinolein	1257,3	1092,0	4019,0	12785,9	0,12
Robustine	914,4	2233,0	2100,3	3813,1	0,12
B-Norcholest-4-en-3-one	5876,1	6046,3	39573,5	157616,0	0,12
Ile-Leu-Arg-His	2145,6	2312,2	3422,4	4386,4	0,12

Calcitriol	117,8	139,6	654,9	2552,3	0,13
Homocysteine	4301,0	2959,1	7176,7	12928,6	0,13
L-Lysine	928,7	946,2	1468,8	2019,3	0,13
alpha-D-Mannoheptulopyranose	1820,6	1535,8	1209,1	908,5	0,13
Phytosphingosine-1-P	2103,2	2892,5	987,8	835,4	0,14
Methylguanidine	3692,1	4166,6	5748,1	6662,3	0,14
Histidiny-Proline	653,1	671,8	971,6	996,8	0,14
L-Glutamine	7861,4	6286,9	11030,7	10952,0	0,14
5-Nonyltetrahydro-2-oxo-3-furancarboxylic acid	827,5	876,6	1215,2	1102,6	0,14
N,N-dimethylacetamide	5396,5	3496,7	7516,6	8670,5	0,15
2-Acetyl-3-methylpyrazine	7049,2	5647,4	10554,5	14534,2	0,15
[DG(8:0/8:0)] 1-(8-[5]-ladderane-octanyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerol	1015,9	856,1	1559,9	2316,6	0,15
D-Erythroascorbic acid 1'-alpha-D-xylopyranoside	1339,1	535,2	1098,0	752,8	0,15
L-Isoleucine	8811,8	18349,2	18669,2	38750,8	0,16
Ala-Ala-Asn-Pro	403,0	823,8	1138,8	3509,0	0,16
342.2887@2.7849	40260,4	38661,8	290704,5	1298474,7	0,16
645.6056@3.1953	2300,8	1084,4	1884,6	918,3	0,17
Prop-2-en-1-yl 4-(2-tert-butylhydrazinylidene)pentanoate	4027,4	7646,1	7194,8	9205,5	0,17
977.8176@2.9989	89,1	69,2	127,4	159,8	0,17
TG(24:1(15Z)/24:0/22:2(13Z,16Z))	1470,2	1837,1	2440,4	3924,3	0,17
[FA amino(4:0)] 2-amino-4-cyano-butanoic acid	48796,3	54733,0	29284,7	20865,2	0,17
N-(2-hydroxyhexacosanoyl)-4,8-sphingadienine	131,6	110,4	184,8	202,7	0,17
α-methyl-glutamate	4837,6	5225,4	7241,1	8688,2	0,17
Campestr-4-en-3-one	1542,1	3422,8	7645,4	32176,8	0,17
195.1187@1.145	3331,5	2399,3	4274,6	2578,3	0,17

Lys-Val-Gln	397,0	591,9	2582,7	11770,4	0,18
Actinonin	2624,9	1545,9	2070,7	965,5	0,18
204.8065@0.5802	6600,9	767,7	6909,2	937,1	0,18
Casimiroin	1988,7	5396,6	4524,5	9887,2	0,18
PE(35:0)	3306,3	2245,8	2469,6	2047,3	0,18
[FA hydroxy(18:1)] 17-hydroxy-9Z-octadecenoic acid	348,8	451,3	1588,7	6771,7	0,18
Glycerol triundecanoate	480,9	286,7	750,2	1405,5	0,19
Bis(2-furanylmethyl) disulfide	3608,2	1123,0	3174,6	1317,2	0,19
Leu-Lys-Thr-Thr	534,2	447,3	3648,4	17570,2	0,19
2-(m-Chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	2807,3	999,2	3185,7	1137,2	0,20
TG(14:0/15:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	3597,2	1999,3	2876,2	1827,7	0,20
Linezolid	6250,9	16386,8	893,3	2405,7	0,20
Triethanolamine	2157,5	2844,2	45549,3	247012,7	0,20
Propafenone	2028,1	925,1	1704,3	724,4	0,20
491.3947@2.7823	763,7	1772,4	2188,7	7545,0	0,20
1,3-Bis(2,3,5-trihydroxyphenyl)propane-1,3-dione	2694,1	2001,8	3489,4	2802,0	0,20
Ethyl aconitate	3379,3	1811,5	4609,8	6374,4	0,21
p-Fluorophenylalanine	11944,3	7799,9	14832,0	8899,4	0,21
Succinimide	836,4	730,4	1102,4	833,7	0,21
(S)-2,3-Epoxy-squalene	529,3	1028,4	3456,5	17276,3	0,22
11-amino-undecanoic acid	3481,6	6031,6	5763,1	8017,9	0,22
166.8492@0.5968	1689,7	412,7	1857,6	679,9	0,22
Ala-Leu-Phe-Arg	424,4	392,3	4060,2	21915,4	0,22
Camoensine	2634,1	1320,6	3094,9	1406,8	0,23
2-(Ethylsulfonylmethyl)phenyl methylcarbamate	2749,5	1256,4	2319,9	1245,3	0,23
Benzyl sulfate	7270,4	9376,8	11609,1	20333,2	0,23

162.8567@0.6052	4688,0	559,2	4901,1	811,8	0,23
12,20-Dioxo-leukotriene B4	967,0	833,3	1379,3	2027,3	0,23
PS(O-38:2)	1965,7	541,9	2181,6	882,7	0,23
L-prolinylglycine	376,2	331,8	622,1	1389,2	0,23
Salmeterol	3231,5	1452,3	2732,4	1578,7	0,24
Asp-Trp-Val-Tyr	684,7	601,0	484,5	578,0	0,24
2-(3-Hydroxypropoxy)propan-1-ol	9703,8	8733,8	12893,0	12117,6	0,24
Prolylhydroxyproline	13801,2	30052,9	4710,1	12940,7	0,24
PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	682,8	348,4	816,1	551,3	0,24
190.1424@1.2388	800,1	862,7	1098,6	1049,1	0,25
192.1365@1.5704	8300,4	5614,3	10136,1	5586,8	0,25
Pantothenol	130673,0	273223,5	49303,1	126477,5	0,25
Palonosetron	8346,2	4257,5	7055,1	2749,6	0,25
Lindheimerine	6380,3	2295,3	5632,9	2386,1	0,26
361.9188@0.9524	2396,2	807,4	2652,1	745,0	0,26
Hydroxydestruxin B	3728,6	2191,9	4541,0	3448,6	0,26
175.1221@1.3509	9640,7	5804,4	7877,1	4198,1	0,26
3-O-(beta-D-glucopyranosyl)-campest-5-en-3beta-ol	1110,9	670,8	902,5	569,1	0,26
683.2043@3.279	5175,9	2264,2	4427,3	2589,5	0,26
[FA oxo,hydroxy(5:1/5:0)] (1S,2R)-3-oxo-2-(5'-hydroxy-2'Z-pentenyl)-cyclopentaneacetic acid	48593,7	37951,4	62000,1	54630,6	0,26
N-Methylpyridinium	999,5	2058,3	2631,5	10052,9	0,26
160.8769@0.7887	604,0	385,7	736,9	519,0	0,26
METHYL (-)-SHIKIMATE	12034,5	18223,2	6674,9	11539,2	0,27
Cholesterol sulfate	4382,3	2721,0	11900,9	49996,1	0,27
O-butanoyl-carnitine	16283,0	16185,6	11497,9	12019,8	0,27
FA oxo(14:2) cyclopentanebutanoic acid	4682,3	2667,1	3798,1	3544,2	0,28
L-Arginine	6316,6	4747,3	10064,3	24028,1	0,28

221.0155@0.6822	900,5	352,6	1047,9	779,2	0,28
L-Alanine	12505,7	7596,2	16061,6	20111,5	0,28
carboxynorspermidine	2515,1	1887,3	3676,5	7262,9	0,29
Ala-Lys-Thr-Val	460,2	488,2	19231,1	129492,0	0,29
Citrulline	2377,5	2157,3	4546,6	14478,5	0,29
229.1188@1.0897	1727,5	3447,0	773,9	1919,1	0,29
Ergothioneine	2543,8	1227,7	2187,1	1048,8	0,29
244.2155@3.7467	551,8	569,6	2303,8	12133,4	0,29
N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	4173,0	4695,3	5867,7	8192,3	0,29
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	5851,6	2783,3	6704,3	3145,1	0,29
GlcCer(d18:2/20:0)	370,2	268,2	470,5	509,7	0,29
Ornithine	1288,2	880,8	1567,4	1131,5	0,30
Hydroxypropyl-Methionine	9613,0	10384,4	13049,7	15114,2	0,30
Epinephrine	8206,5	6216,1	6483,2	4097,3	0,30
184.8424@0.6136	1686,2	321,7	1790,3	441,2	0,30
Arg-Lys-Phe-Gln	967,8	1176,0	635,1	944,9	0,30
Avadharidine	333,5	473,7	484,9	657,9	0,30
520.5006@3.0243	289,7	211,1	372,1	454,4	0,31
His-Lys-Lys-Val	9379,3	32914,8	986,9	2033,7	0,31
L-Lactic acid	225510,2	126475,8	263428,7	150554,7	0,31
201.8128@0.5802	8892,6	711,5	9142,8	1309,7	0,32
Argenteane	1094,9	713,5	902,4	542,4	0,32
Trospium chloride	1375,5	1683,8	2013,3	3578,9	0,32
Prostaglandin E2	904,0	1191,3	1309,3	2079,5	0,32
3-Buten-1-amine	5337,3	2219,6	6130,9	4280,4	0,32
399.2813@2.3754	603,8	397,4	497,9	287,7	0,32
Tetranor-PGF1alpha	1567,4	3560,5	663,9	1321,8	0,32
2-O-Benzoyl-D-glucose	2774,0	1382,6	2397,3	1189,3	0,32
174.0405@0.9534	2799,1	2511,2	2139,0	1817,9	0,33
Beta-Carboline	7662,1	5890,2	9501,2	8751,2	0,33

314.1263@2.4474	1973,5	1742,7	1515,4	1284,9	0,33
115.0738@1.2627	5292,9	2233,6	5968,9	3067,0	0,33
280.0471@0.7719	1211,5	683,3	1426,9	1044,7	0,33
L-Phenylalanine	14071,2	8118,5	16963,8	16330,2	0,33
Biliverdin	10402,8	9497,3	7843,3	8709,8	0,33
206.1518@2.2096	5434,9	3466,9	6423,7	4141,9	0,33
D-Glucose	15970,0	12991,7	12499,5	11788,8	0,33
192.8657@0.6552	3062,3	1029,8	2793,2	833,8	0,34
PI(18:2(9Z,12Z)/ 20:2(11Z,14Z))	554,6	446,3	2069,6	11610,7	0,34
Butorphanol	10144,5	4130,6	9044,9	3837,4	0,34
Uric acid	4785,9	4352,8	3706,6	2361,4	0,34
5-Ethyl-4-methyl-2- octylthiazole	39141,6	21633,7	33103,2	25294,0	0,34
Borrelidin	2165,1	2049,9	1660,5	1084,2	0,34
513.5124@2.9373	648,7	271,6	758,1	697,7	0,34
488.8096@2.0655	1674,8	4209,9	665,7	1429,7	0,34
4,5-Dihydro-2,4(5)- dimethyl-1H-imidazole	1561,6	1441,3	1984,2	2098,5	0,35
124.0998@2.359	2502,5	2105,7	3126,0	3184,8	0,36
519.5002@3.0198	1267,1	332,5	1167,3	521,2	0,36
93.9353@0.5636	5370,1	1356,9	5765,9	2004,2	0,36
Ala-Lys-Pro-Ser	6049,7	21173,5	1205,6	2244,0	0,36
290.1383@3.3312	33940,3	88777,5	13521,8	20224,8	0,36
Guanidine	16963,1	13166,0	13896,1	5105,0	0,36
243.0597@0.7052	8257,5	6317,2	6675,1	5420,2	0,36
3-(1-Hydroxymethyl-1- propenyl)pentanedioic acid	1019,1	376,7	1122,6	485,8	0,36
Narciclasine	1824,2	789,2	2099,9	1742,0	0,37
Ammonium lactate	4409,0	764,3	4201,3	971,7	0,37
Glycerol 1-(9Z- octadecenoate) 2- tetradecanoate 3- phosphate	1662,9	1149,6	1369,7	1157,2	0,37
5-Oxo-2(5H)- isoxazolepropanenitrile	64304,8	62027,1	48739,6	59347,0	0,37

3-Hydroxy-2-naphthoate	7588,3	4492,9	8689,5	3981,8	0,37
135.0899@1.1729	4779,4	4457,9	3708,7	3544,2	0,37
1011.0305@0.8241	5576,2	2508,3	6234,8	3111,0	0,38
179.8881@0.8065	1928,1	1474,4	2310,0	1817,1	0,38
Arg-Lys-Val-Ser	4720,8	13249,0	1823,5	3755,6	0,39
194.823@0.5802	39319,0	3018,3	40143,1	4382,7	0,39
SM(d34:1)	12937,7	7176,4	14786,9	8847,9	0,39
89.9697@0.9622	57822,3	20188,8	62660,3	19042,3	0,39
PE(22:1(13Z)/15:0)	42044,3	39167,3	32934,9	32356,6	0,39
869.1906@3.0642	66,7	161,9	125,0	409,5	0,39
Ile-His	930,6	269,7	1375,2	3801,6	0,39
254.8348@0.6302	4645,6	778,2	4462,7	707,7	0,40
2-iodophenol	6078,6	1238,9	6375,3	1236,1	0,40
N-desmethylmirtazapine	38522,8	96800,7	16135,7	82497,3	0,40
333.9289@1.0303	1694,2	514,1	1578,9	355,3	0,40
N-Methylaspidospermatidine	18169,1	9792,3	15865,0	9198,7	0,40
[SP (3:0)] sphinga-4E,8E,10E-trienine	32414,9	122502,5	6579,9	18763,2	0,40
14,19-Dihydroaspidospermatine	10698,3	4598,1	9655,8	3561,5	0,40
262.8207@0.614	4717,1	902,5	4512,7	696,4	0,40
Cimifugin	25832,9	98729,6	4932,4	28303,4	0,40
661.1731@3.2922	3019,2	1499,5	2661,3	1569,1	0,40
248.9614@1.9222	6149,5	16068,8	10295,9	22271,9	0,40
257.8298@0.6299	5598,5	812,8	5410,8	757,6	0,41
314.1272@2.4407	4955,1	5495,5	3759,7	3400,4	0,41
PC(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/ 20:2(11Z,14Z))	8332,6	4337,6	9461,8	6223,9	0,41
416.6541@0.5975	28216,5	5071,6	26956,2	6363,4	0,41
Urea	240197,7	91816,2	219692,5	73081,3	0,41
Adenosine	190147,0	185115,4	148460,7	163719,9	0,41
3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene	6300,6	10558,8	4086,8	4817,6	0,41

(-)-Pyrifolidine	5804,0	3476,9	5050,1	2398,8	0,41
259.8268@0.622	5577,3	1054,7	5343,8	866,4	0,41
2-Methylhexanoyl-CoA	233,1	661,2	654,9	3678,9	0,42
123.9155@0.9788	3244,8	1251,2	2980,1	850,0	0,42
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	1046,9	1050,2	1300,9	1369,6	0,43
Compound VII	1418,5	4425,1	512,2	2181,0	0,43
L-Methionine	972,2	1029,6	1276,9	2141,1	0,43
1168.9565@1.9222	10402,3	25790,8	16559,6	32993,0	0,43
3-[4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2-propenal	19998,3	34808,8	12726,9	23326,7	0,43
Uridine	1956,4	1374,3	1665,3	1066,0	0,43
749.4002@3.5227	730,7	612,1	597,5	575,9	0,43
2,4-Dinitrophenol	4262,3	2841,9	4948,2	3911,0	0,43
907.6177@2.8142	2167,4	1216,6	2501,6	2262,4	0,43
N-acetyl-tryptophanamide	928488,1	994470,7	716532,3	857881,9	0,44
Anatalline	865,1	1041,3	1138,3	1810,3	0,44
His-Leu-Val-Val	3027,4	7618,3	1511,1	4244,4	0,44
621.4014@2.7904	1782,2	779,4	1960,9	973,2	0,44
[FA amino(16:0)] hexadecanoic acid	18834,4	74778,8	4516,0	15481,9	0,44
4-Hydroxyproline	1321,1	1236,7	1592,2	1329,6	0,44
870.1882@3.0578	72,5	224,8	156,7	704,1	0,44
Metenamine	59334,4	109514,8	172122,7	1071466,1	0,45
N-Desmethylaminopyrine	881688,1	1505517,2	577451,7	1072119,0	0,45
253.1889@1.9752	5249,0	4061,9	4378,1	4313,9	0,45
Hydroxybutyrylcarnitine	8037,2	10806,5	5913,3	6780,8	0,45
157.9568@0.9599	11179,4	3636,7	11930,0	3245,5	0,45
N-(hexadecanoyl)-hexadecasping-4-ene-1-phosphoethanolamine	1388,3	811,0	1606,4	1568,6	0,45
Alpha-Linolenic acid	9814,1	14297,0	30107,6	199138,1	0,46
L-Acetylcarnitine	686586,8	495960,1	587540,8	381441,8	0,46

635.3366@1.8437	401,4	694,3	264,8	484,4	0,46
1-18:2-2-18:3-phosphatidylethanolamine	978,1	1822,2	1407,1	2713,8	0,46
Isocarboxazid	74087,5	79909,3	58063,3	66311,5	0,46
Vitisidin A	12184,8	16324,7	8881,4	14520,0	0,46
Polyethylene glycol	3258,4	5676,4	2057,3	6215,0	0,46
Gln-Lys-Lys-His	770,1	492,6	663,5	587,4	0,46
N3-methylthymine	45729,5	85376,0	136526,3	900027,8	0,46
144.1009@1.195	10038,8	5389,1	11210,4	6589,1	0,46
Asn-Ile-Ile-Val	603,6	497,1	719,4	753,8	0,47
613.1739@3.2837	2613,0	1592,2	2290,5	1534,1	0,47
Creatinine	928542,3	365877,9	1004260,3	390062,9	0,47
Ile-Lys-Ala-Gly	11401,5	19034,8	7635,9	16797,8	0,47
615.1698@3.2861	47872,1	27847,6	42177,1	28955,4	0,47
805.2011@2.9726	125,0	346,0	246,0	1073,2	0,47
Ala-Lys-Gln-Arg	640,8	353,5	710,3	309,8	0,47
Leucyl-Alanine	42253,0	35565,2	49393,2	35138,2	0,47
Arg-Lys-Lys-Cys	995,3	1298,0	742,6	1107,6	0,48
Cidofovir	317,6	194,9	362,2	298,0	0,48
138.0142@0.7135	144,0	196,5	104,7	202,7	0,48
412.6602@0.5969	44009,8	11113,3	41846,8	10138,4	0,48
L-Carnitine	1521298,5	965805,0	1339107,1	738128,3	0,48
4-carboxy-2-hydroxypenta-2,4-dienoate	1778,5	950,4	1991,2	1422,4	0,48
222.1468@1.5928	3133,4	2123,7	2718,0	2039,8	0,48
(2R,3R,4R)-2-Amino-4-hydroxy-3-methylpentanoic acid	1069,9	848,7	1243,7	993,2	0,48
72.0327@0.7691	2274,9	1613,8	1980,5	1064,2	0,49
1-Palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	742,3	939,6	564,5	837,5	0,49

Guanosine, 2'-deoxy-8- ((4,6-dimethyldipyrido(1,2- a:3',2'-d)imidazol-3- yl)amino)	242,3	168,9	209,4	178,6	0,49
14,19-Didehydrocondyfolan	485513,1	371808,1	415427,7	335035,3	0,49
2-bromoporphobilinogen	1076,1	373,2	1002,0	431,4	0,50
561.8385@1.936	1997,7	3473,7	1366,5	2724,2	0,50
paspalate	5857,1	7393,4	4466,2	7423,0	0,50
Hexadecanedioic acid	260,8	404,7	333,5	318,6	0,50
583.8516@1.9516	2532,7	4337,7	1752,3	3486,8	0,51
L-Serine	2765,3	3525,0	2094,8	3829,0	0,51
80.9809@0.9861	700,5	355,3	774,8	520,5	0,51
203.8099@0.5802	2185,5	293,9	2246,4	423,0	0,51
PC(36:2)	4477,2	3596,3	3780,2	4286,4	0,51
Lys-Asn-Pro	2141,7	5106,6	1287,3	2338,0	0,51
158.8795@0.7887	4145,4	2061,8	4519,5	1914,0	0,51
Astrocasine	1045,5	579,7	941,9	513,8	0,51
204.8519@0.6052	3693,9	818,7	3836,6	672,9	0,52
202.8097@0.5802	86296,4	5779,0	87501,9	9367,0	0,53
2-Hydroxy-3-methylbutyric acid	2259,9	1464,7	2534,7	1782,9	0,53
Ile-Leu-Lys-Tyr	2432,1	2189,5	2869,4	3260,2	0,53
Creatine	789372,0	429289,6	865708,7	442287,1	0,53
605.8768@1.0053	1404,1	437,2	1480,3	412,5	0,53
583.35@1.9515	3394,7	6065,2	2365,9	5029,7	0,53
693.4156@2.0512	4188,0	7639,9	2916,1	6146,0	0,54
3-O- Sulfogalactosylceramide (d18:1/22:0)	884,5	958,6	1066,0	1317,8	0,54
196.819@0.5802	764958,1	61072,0	776624,0	86591,4	0,54
N-Desalkyl flurazepam	5744,1	3029,3	6251,8	2711,2	0,54
Malathion monocarboxylic acid	2067,9	841,7	1923,6	852,3	0,54
N-(eicosanoyl)-1-beta- glucosyl- pentadecasphing-4-enine	390,2	349,0	333,8	258,4	0,54

1-5-diazabicyclononane	13711,1	7525,8	12401,2	8270,9	0,55
Arg-Met-Gly-Pro	1329,8	1164,9	1625,2	2929,6	0,55
1-Pyrimidinylpiperazine	12021,7	3342,9	11416,5	4258,1	0,55
Cucurbitacin B	826,6	710,6	947,3	725,2	0,55
Thr-Cys-Pro	5400,3	9129,0	3778,8	11369,4	0,55
(Cyclohexylmethyl)pyrazine	16822,2	6336,9	17987,2	8774,5	0,55
Ala-Phe-Pro-Arg	1256,6	2306,6	895,7	1669,5	0,56
1-Pyrrolidinecarboxaldehyde	32881,9	20674,1	37886,5	50642,8	0,56
635.4159@3.0221	2325,3	1497,9	2073,6	1709,3	0,56
Prolyl-Alanine	3758,5	3389,3	3175,6	4234,8	0,56
128.8779@0.6218	1775,1	665,5	1673,7	480,8	0,57
PS(26:0))	7540,3	5645,0	8464,2	6055,4	0,57
Hexazinone	22617,4	13802,4	20396,7	14265,7	0,57
5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil	2070,6	1617,2	1818,8	1432,2	0,57
159.8542@0.6385	3666,7	985,3	3822,8	964,1	0,57
PC (40:5)	2883,9	1405,8	3124,6	1836,1	0,57
868.1897@3.0636	101,6	303,5	155,7	444,4	0,57
Inosine	9107,7	6566,2	10232,4	8909,4	0,58
178.1204@1.3771	3990,0	2033,7	3671,4	2015,7	0,58
693.9174@2.0467	2731,9	4750,4	2006,7	4295,4	0,58
245.075@0.6907	6816,5	6052,5	7873,0	9099,9	0,58
Arg-Lys-Lys-Ser	753,9	346,8	815,7	550,2	0,58
157.9992@0.9976	6442,7	9563,6	5033,3	7825,8	0,59
627.3764@1.996	3542,9	6733,3	2529,9	6216,7	0,59
Biperiden	3831,3	1741,3	3555,8	2038,5	0,59
197.9545@1.0216	1409,8	435,1	1345,9	367,8	0,59
156.8819@0.797	5158,5	2575,4	5545,3	2478,9	0,59
Pindolol	7957,3	4081,7	8579,6	4213,4	0,59
PC methyl(16:0)	1091,7	787,6	1247,4	1593,1	0,59
SM(d18:1/24:0)	666,7	366,4	611,5	366,4	0,59

[FA amino(8:0)] 3-amino-octanoic acid	91742,7	56842,3	83555,7	45524,4	0,59
633.8681@0.9514	1326,7	509,9	1256,1	302,4	0,59
414.6571@0.5969	46011,5	10638,9	44397,9	11185,9	0,59
759.4549@2.0927	1984,5	3440,5	1482,9	3082,2	0,60
[FA dimethyl,amino,tri hydrox] 1-dimethylamino-9S,11R,15S-trihydroxy-5Z,13E-prostadiene	853,9	971,1	711,1	917,1	0,60
615.4568@2.6911	1741,2	2041,8	1451,2	1598,3	0,60
212.8387@0.6052	2038,3	377,7	2095,8	417,2	0,60
165.8439@0.6383	18775,1	4373,4	19438,5	4895,0	0,60
194.9581@0.8272	1074,2	813,4	1194,8	840,9	0,60
GYKI 52466	9136,2	5258,9	8372,4	5162,9	0,60
671.4026@2.0311	2664,4	4681,0	1990,0	4479,6	0,60
Ile-Leu-Lys-Thr	869,4	511,1	941,0	460,9	0,61
(2R*,3R*)-1,2,3-Butanetriol	18493,7	29811,6	14633,6	13284,8	0,61
178.8526@0.6053	2686,2	521,7	2758,8	460,1	0,61
PE(19:0)	164098,3	129196,5	188498,6	267578,5	0,61
182.8453@0.6051	5193,2	1275,5	5374,3	1284,1	0,61
903.5797@2.6004	622,9	373,7	682,2	545,8	0,61
PS(13:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	2570,6	4546,5	1932,9	4409,1	0,61
[PC (16:1)] 1-(9E-hexadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	12558,9	8136,8	11331,4	10382,7	0,62
17-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid (17-HETE)	988,2	713,3	883,1	845,8	0,62
(S)-piperazine-2-carboxamide	17419,1	12178,4	19392,2	18893,1	0,62
L-2-Amino-3-methylenehexanoic acid	8123,1	6284,5	7262,4	5530,3	0,62
164.8531@0.6052	4683,5	874,3	4806,3	871,2	0,62
Strobamine	1006,2	1185,9	1174,2	1237,6	0,62
LysoPC(18:0)	14326,2	8102,1	15646,0	12915,6	0,62
Ethylmorphine	1788,9	3415,8	1343,7	2174,9	0,62

453.929@0.997	1870,9	827,9	1982,3	714,3	0,62
234.1117@1.5233	6391,3	4637,8	7372,3	12074,5	0,62
7-(Methylthio)heptanenitrile	14125,4	4155,5	14701,6	4327,6	0,62
Ile-Leu-Lys-Met	1480,0	1245,5	1315,6	1051,5	0,63
565.3365@2.6809	2217,5	1301,6	2040,7	1292,4	0,63
Biotin amide	1209,0	2289,2	881,1	2890,0	0,63
737.9435@2.0769	1767,7	3102,8	1353,4	3086,9	0,63
Pyruvic acid	3490,2	2383,5	3188,4	1813,6	0,64
Ala-Lys-Ala-Arg	2531,8	5951,4	1773,1	4762,8	0,64
Arg-Lys-Tyr-Arg	642,4	854,5	531,8	798,4	0,64
129.9669@1.0219	21485,9	6578,3	20692,8	4550,1	0,65
133.9955@0.8123	892,7	272,2	930,2	359,8	0,65
destruxin B	1260,4	460,6	1194,2	682,2	0,65
Guanosine	1131,1	1315,6	1447,5	4601,8	0,65
715.9305@2.0625	2397,2	4182,2	1874,7	3964,7	0,65
[FA (30:0)]	3628,4	1598,5	3417,8	1905,4	0,65
(E)-Urocanic acid	225510,5	164122,9	202689,8	232323,8	0,65
L-Glutamic acid	1095,1	849,4	1207,8	1071,5	0,66
190.1208@1.6142	929,3	740,1	1027,9	946,9	0,66
225.8349@0.6302	2956,5	1335,1	3115,0	1032,2	0,66
249.0477@1.2139	870,6	405,6	819,3	435,3	0,66
565.8809@0.9513	1386,4	432,1	1437,6	334,8	0,66
5-Deoxyribose-1-phosphate	1158,2	930,1	1039,1	1057,0	0,66
PE(17:0)	3678,5	1983,4	3420,3	2524,6	0,66
1-Linoleoylglycerophosphocholine	34716,9	16342,2	32609,1	20963,9	0,67
L-lysine-p-nitroanilide	6474,3	3882,6	6033,3	2821,1	0,67
(2S,4R)-4-(9H-Pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-1,2,4-butanetriol	1171,8	1015,6	1310,0	1535,5	0,67
547.8309@3.7685	244,9	325,4	208,8	197,0	0,67
942.2036@3.1643	196,4	350,4	156,4	282,7	0,67

83.9614@0.9826	19040,3	6533,7	18302,4	4939,6	0,67
(R)-(E)-Sulforaphene	7074,9	4743,5	7638,9	4937,5	0,67
Gabaculine	4366,9	2047,9	4604,0	2238,7	0,69
PC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/ 20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	2347,5	1290,5	2194,9	1568,7	0,69
Norbuprenorphine	915,0	415,7	976,7	859,2	0,69
260.8238@0.6063	28312,8	3861,9	27892,3	3368,3	0,69
Arg-Lys-Phe-Arg	4933,9	8803,4	3972,1	8016,4	0,69
Pyrimidine 5'-nucleotide	4848,2	3954,9	4417,2	3678,5	0,69
PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))P-18:1(11Z))	4742,7	1763,5	4528,1	2448,3	0,69
737.4418@2.0812	1477,0	2743,7	1176,6	2660,0	0,69
2,3-dichloromaleylacetate	12300,2	5313,0	12858,4	4320,8	0,70
TG(15:0/16:1(9Z)/ 18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	735,3	806,0	654,6	511,2	0,70
256.83@0.6057	77314,1	9945,9	76256,2	10182,2	0,71
PC(38:5)	17380,3	10184,1	18549,3	13882,7	0,71
Asymmetric dimethylarginine	2099,9	2114,8	2328,5	2410,2	0,71
OR-1855	146945,1	216830,9	125398,3	177733,1	0,71
661.5996@3.014	768,6	368,6	807,0	391,7	0,71
Arg-Lys-Lys-His	1167,9	1057,5	1063,8	852,9	0,71
526.655@2.1094	1318,8	2384,1	1072,9	2503,3	0,72
Heterodendrin	2889,5	1970,3	3171,6	4568,4	0,72
521.9159@0.9887	2095,7	977,4	2004,0	698,7	0,72
Arg-Tyr-Arg-Arg	4400,0	7968,1	3631,8	7300,0	0,73
979.9826@0.7939	6418,8	5248,2	6918,0	4599,5	0,73
3-Hydroxy-2-(4- morpholinylmethyl)estra-1,3 ,5(10)-trien-17-one	1227,9	448,1	1182,7	512,2	0,73
265.9417@1.0303	1845,7	636,8	1903,4	410,2	0,73
PE(27:1)	1828,7	4069,4	2233,3	4541,3	0,73
Isopiperolein B	9249,9	13344,1	7862,0	17355,8	0,73
Adenosine monophosphate	2059,4	1160,8	2171,0	1161,7	0,73
Spirasine I	1017,8	620,6	960,3	515,5	0,73

D-Sedoheptulose 7-phosphate	2849,2	1483,2	2984,6	1156,1	0,73
163.8469@0.647	60513,1	13491,9	61817,7	14845,2	0,74
ε-aminocaproamide	1036,2	1439,0	905,4	1238,5	0,74
PS(38:3)	1229,0	348,0	1273,8	778,9	0,74
Ala-Leu-Lys-Ala	2448,5	1599,2	2306,3	1303,9	0,74
(+)-O-Methylarmepavine	1668,8	770,8	1738,3	702,1	0,74
(-)-Aspidospermine	816,3	833,3	739,9	860,9	0,75
589.9029@0.9804	2095,7	963,5	2181,5	938,0	0,75
9-Hydroxyoctadecadienoic acid	1752,6	1512,8	1614,7	1646,9	0,75
497.8935@0.952	1702,5	625,1	1754,5	418,3	0,75
[FA hydroxy(18:0)] 9,12-dihydroxy-octadecanoic acid	852,5	627,8	793,8	769,5	0,75
Phenindamine	4088,1	2967,3	3842,7	2023,0	0,75
244.7626@0.5969	652,3	299,4	626,7	288,1	0,76
Tolbutamide	1678,6	1245,0	1572,5	1171,0	0,76
delta-Guanidinovaleric acid	2882,7	1383,2	2998,0	1337,1	0,76
Conocurvone	3008,8	3029,8	3261,4	2956,6	0,76
Lansiumamide A	40952,6	54795,8	45495,5	63721,9	0,78
Lys-Thr-Val-Val	935,5	533,1	892,5	571,9	0,78
p-Phenolsulfonic acid	3756,8	7238,2	4426,7	11896,8	0,78
Glu-Lys-Lys-Gln	1319,6	984,4	1243,7	925,8	0,78
Neurine	443446,4	200863,5	426130,9	282555,2	0,78
Ala-Phe-Val-Gly	474,3	432,1	515,2	760,7	0,78
207.0479@0.9592	689,5	230,2	708,0	265,8	0,78
213.173@2.4747	3707,5	4759,4	4079,0	4917,8	0,78
199.1573@2.4151	806,5	2048,4	658,1	1403,2	0,78
LysoPC(18:1(11Z))	30238,9	25862,0	28235,6	26707,0	0,78
180.8485@0.6052	6958,9	1171,6	7051,8	1324,8	0,78
Mannitol	17034,4	14890,9	18323,1	22192,7	0,78
385.942@0.997	1899,1	645,7	1851,6	553,7	0,79

469.9029@1.0137	1348,4	299,1	1325,5	319,7	0,79
L-Cysteine, N-acetyl-S-(2-oxopropyl)	1211,9	1080,6	1302,0	1546,6	0,79
241.6354@2.1155	2184,8	770,2	2244,6	901,9	0,79
Propofol glucuronide	13293,3	27690,4	15325,4	26590,0	0,79
N-acetylphospho-phosphonoacetyl-L-ornithine	4845,6	3748,5	5156,1	5498,4	0,79
151.9486@0.9755	2598,6	831,2	2539,7	694,3	0,79
LysoPC(22:2(13Z,16Z))	2772,7	6978,0	2309,7	4373,9	0,80
429.9061@0.952	2035,5	702,3	2082,5	533,4	0,80
Pro-Thr-Val-Val	7097,3	12376,6	6202,5	14354,7	0,80
LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2205,0	2186,4	2065,7	1253,0	0,81
9-Carboxymethoxymethylguanine	10204,6	4732,9	10580,3	7663,3	0,81
161.8499@0.6552	66747,4	15950,8	67833,6	16283,9	0,81
313.2102@2.0309	2765,4	1965,6	2896,1	1936,0	0,81
(-)-Tortuosamine	1054,8	604,5	1009,3	907,1	0,81
guanidinocaproate	1085,3	1172,2	1172,6	1723,8	0,81
Ala-Lys-Ala-Pro	1105,2	704,6	1056,0	866,6	0,81
657.89@0.9803	1468,4	787,1	1517,6	622,2	0,82
258.8269@0.6057	78601,3	10224,9	77937,4	10169,2	0,82
Arg-Leu-Trp-His	318,8	270,9	337,3	330,4	0,82
2-hydroxydesipramine	6389,2	8298,0	5813,3	10647,6	0,82
96.0326@1.0666	42705,1	17416,3	41533,4	20281,3	0,82
223.8384@0.6302	3168,8	1243,3	3245,9	1078,7	0,82
Ondansetron	1895,0	2721,2	2073,6	3068,5	0,82
465.3692@2.7076	1969,2	4262,6	1723,2	2110,8	0,82
Arg-Cys-Arg-Arg	663,9	344,7	642,2	357,9	0,82
Lactosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1245,6	880,7	1302,8	1032,0	0,82
Z-Tyr-Leu-NHOH	792,9	402,4	765,5	540,5	0,82
58.9837@0.793	10389,6	7789,9	10853,8	6797,6	0,83

725.877@0.9886	1078,2	709,1	1120,0	585,5	0,83
Cholesta-3,5-dien-7-one	788,8	453,5	817,9	545,5	0,83
Propionylcarnitine	78225,1	58852,1	74596,4	65465,1	0,83
597.4828@2.9323	457,0	618,9	492,5	531,2	0,83
215.888@0.6636	2476,2	1776,6	2378,2	1196,8	0,83
D-erythro-L-galacto-Nonulose	1242,8	730,0	1202,4	634,4	0,84
DG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:2(11Z,14Z)/0:0)	331,5	336,6	349,4	231,7	0,84
[SP] (3'-sulfo)Galbeta-Cer(d18:0/2-OH-24:0)	118,3	120,4	127,7	269,5	0,84
Lys Lys Phe Pro	2420,1	2050,8	2285,4	3341,5	0,84
N-(2-hydroxytetracosanoyl)-4,8-sphingadienine	615,2	310,5	634,3	431,5	0,84
Arg-Leu-Leu-Phe	1408,9	1906,5	1312,0	1271,2	0,85
Tetrahexosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1491,4	534,1	1463,6	461,5	0,85
2,3-Dihydroxy-2,4-cyclopentadien-1-one	946,3	648,5	911,4	679,0	0,85
4-(Dodecylsulfanyl)-4-oxobutanoic acid	2842,5	5869,7	3126,6	3830,9	0,85
LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	10967,8	4637,5	11219,9	5626,0	0,85
3-Dehydroxycarnitine	96338,1	51770,5	93824,8	43210,7	0,86
220.8544@0.6492	3091,3	1791,2	3177,5	1450,9	0,86
Ile-Leu-Tyr	516,4	692,5	552,0	863,8	0,86
591.3713@2.3886	1749,7	2453,7	1865,6	2229,1	0,86
Glycerophosphocholine	44560,4	31893,4	46261,2	45583,1	0,86
Ile-Pro	43978,3	38100,4	45755,7	37747,3	0,87
PS(O-36:2)	7794,2	2245,6	7679,2	3088,7	0,87
Felodipine	29652,9	64707,6	26695,6	63533,6	0,87
N-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-L-serine	1660,5	1023,1	1612,0	1195,6	0,87
Na-L-Glutamyl-L-aspartic acid	731,3	273,2	746,4	484,6	0,87
N-Methylethanolaminium phosphate	55801,8	7677,3	56123,3	6675,6	0,88

Glycine	860,9	607,9	886,7	593,4	0,88
Tetrahexosylceramide (d18:1/22:0)	657,5	215,9	648,4	219,0	0,88
Pyroglutamic acid	12184,0	8871,8	11787,0	12755,4	0,89
531.3776@2.7142	2057,3	5453,1	2280,0	5906,2	0,89
188.8693@0.6636	28457,5	9002,2	28121,1	6607,2	0,89
Farnesylcysteine	1341,7	665,8	1312,4	1012,6	0,89
Hypoxanthine	17024,5	11985,4	17494,9	14144,9	0,89
Arg-Trp-Pro-Tyr	111815,2	125686,5	116324,2	108439,4	0,90
1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (n-C18:0)	2086,5	1171,7	2040,2	1508,5	0,90
α-monofluoromethylagmatine	4608,0	3013,9	4718,3	2984,7	0,90
674.6688@2.8812	2058,9	2427,1	2154,4	3189,6	0,90
940.1541@3.0642	7850,6	2602,0	7979,2	5626,8	0,90
126.8809@0.6219	2640,9	1061,1	2603,9	929,4	0,90
Ebastine	301,2	194,5	308,4	227,2	0,90
609.3254@2.8392	1038,7	850,4	1067,4	896,1	0,91
Trigonelline	13500,3	30568,0	14386,2	20600,8	0,91
190.8668@0.6635	17146,1	5866,0	17309,8	4475,8	0,92
2-amino-2-deoxy-isochorismate	3842,5	2164,8	3910,9	3008,9	0,92
Cytochalasin Opho	774,6	785,2	751,9	821,0	0,92
5-Acetyl-2,4-dimethylxazole	35018,1	8353,8	34791,4	6777,0	0,92
Benzaldehyde glyceryl acetal	1026,5	823,2	1004,4	636,1	0,92
Calcidiol	14812,8	8419,1	15045,7	9798,1	0,92
2,5-Dioxopiperazine	1235,6	722,8	1213,7	1150,0	0,93
715.6098@3.1629	1352,5	1469,7	1387,9	893,3	0,93
242.7654@0.5969	941,3	473,8	952,7	353,6	0,93
Glyceric acid	5684,3	7644,0	5488,7	8351,7	0,93
Potassium 2-(1'-ethoxy)ethoxypropanoate	5809,6	3929,6	5715,0	3831,2	0,93

Chamazulene	886,0	1310,4	918,1	1473,2	0,93
PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1338,5	514,7	1324,5	807,5	0,93
L-Threonine	3851,1	6004,0	3992,7	7116,6	0,94
740.3473@2.9573	1633,0	2144,6	1591,2	1399,8	0,94
206.8476@0.6135	59168,7	8632,7	59345,4	8233,4	0,94
[FA (8:1/5:2/7:0)] 5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	14813,2	30373,3	15412,3	25786,6	0,94
641.2406@2.6896	810,5	587,3	822,5	700,2	0,94
186.8533@0.7803	988,7	765,2	1002,9	693,3	0,95
240.768@0.5969	609,2	377,5	602,3	283,9	0,95
337.3352@2.8824	193970,7	256629,5	188340,1	408973,0	0,95
250.1781@1.9264	3707,1	5103,1	3617,3	3483,9	0,95
PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	2874,5	1693,1	2844,3	1812,4	0,95
142.0743@0.8457	13944,8	26200,2	14409,7	34954,8	0,95
243.0722@0.6888	4253,9	1964,9	4282,5	2083,0	0,96
Ricinine	5871,1	13963,6	6084,2	18802,7	0,96
Glu-Lys-Val-Ala	1206,1	1826,8	1180,9	1883,9	0,96
78.9829@0.9864	11492,3	2762,9	11528,5	2174,2	0,96
Chlorin E6	446,0	270,8	450,3	441,2	0,96
Niacinamide	35343,6	13966,2	35521,1	9263,5	0,96
1339.8778@3.0587	702,0	298,9	705,7	241,4	0,96
L-Tryptophan	2189,4	1209,4	2204,5	1308,2	0,97
Buchananine	2329,7	2990,4	2291,2	3930,6	0,97
208.1311@1.4042	27226,4	10864,2	27082,9	17230,4	0,97
PC(16:0/9:0(CHO))	6151,2	3425,3	6109,4	5268,9	0,97
167.8413@0.597	2291,6	604,6	2298,2	718,2	0,97
N-Butyl-beta-carboline-3-carboxylate	2356,0	3370,1	2323,7	2133,2	0,97
664.3413@2.9568	2863,6	3242,9	2832,7	2257,1	0,97
N-Hexadecanoylpyrrolidine	3476,9	2649,4	3453,8	3142,9	0,98

Chenodeoxycholic acid sulfate	1021,1	2146,9	1003,7	2383,4	0,98
633.3242@2.6725	416,8	227,9	415,1	364,4	0,98
Scutianine F	1865,1	1652,2	1855,8	1209,2	0,98
[ST hydrox] (25R)-3alpha,7alpha-dihydroxy-5beta-cholestan-27-oyl taurine	5415,2	4198,6	5440,0	4712,1	0,98
568.3559@2.9308	365,8	377,3	363,8	321,7	0,98
L-Hexanoylcarnitine	2441,9	2054,4	2433,5	2864,2	0,99
594.4876@2.7625	643,7	341,9	644,5	427,6	0,99
Slaframine	19307,8	6833,9	19307,0	4441,8	1,00

1.2. Vergleich zwischen Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe B

Tabelle II: Metabolite ohne statistisch signifikante Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe B					
	Versuchsgruppe A1		Kontrollgruppe B		
Metabolite	Mean	SD	Mean	SD	p-Wert
Paspalate	5857,1	7393,4	1791,5	3724,7	0,05
Hexadecanedioic acid	260,8	404,7	876,6	1398,7	0,05
Arg-Lys-Lys-Cys	995,3	1298,0	314,3	437,0	0,05
2,4-Dinitrophenol	4262,3	2841,9	6205,6	3428,5	0,06
Phytosphingosine-1-P	2103,2	2892,5	643,5	500,6	0,06
115.0738@1.2627	5292,9	2233,6	6788,3	2637,4	0,06
D-Erythroascorbic acid 1'-alpha-D-xylopyranoside	1339,1	535,2	1996,9	1507,6	0,06
Leucyl-Alanine	42253,0	35565,2	63757,8	33049,7	0,06
693.9174@2.0467	2731,9	4750,4	399,6	1024,5	0,06
Arg-Leu-Trp-His	318,8	270,9	173,3	175,8	0,06
671.4026@2.0311	2664,4	4681,0	364,7	1132,4	0,06
L-Glutamine	7861,4	6286,9	21808,9	34605,0	0,06
583.8516@1.9516	2532,7	4337,7	419,0	1048,0	0,07
PS(13:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	2570,6	4546,5	361,4	1045,1	0,07
737.9435@2.0769	1767,7	3102,8	262,3	676,6	0,07

LysoPC(18:1(11Z))	30238,9	25862,0	17097,8	12708,1	0,07
561.8385@1.936	1997,7	3473,7	314,7	889,3	0,07
3-Hydroxy-2-(4-morpholinylmethyl)estra-1,3,5(10)-trien-17-one	1227,9	448,1	936,3	539,3	0,07
N-acetyl-tryptophanamide	928488,1	994470,7	364980,6	850656,1	0,07
(S)-piperazine-2-carboxamide	17419,1	12178,4	35056,6	43190,1	0,07
Asp-Trp-Val-Tyr	684,7	601,0	1344,1	1557,3	0,07
583.35@1.9515	3394,7	6065,2	488,5	1315,3	0,07
Ala-Phe-Pro-Arg	1256,6	2306,6	162,1	258,1	0,07
(-)-Pyrifolidine	5804,0	3476,9	3993,3	2180,0	0,07
174.0405@0.9534	2799,1	2511,2	1542,4	1281,4	0,07
PC(16:0/9:0(CHO))	6151,2	3425,3	4206,2	3087,4	0,07
609.3254@2.8392	1038,7	850,4	597,1	555,3	0,07
627.3764@1.996	3542,9	6733,3	382,2	1137,9	0,07
737.4418@2.0812	1477,0	2743,7	184,9	562,8	0,07
633.3242@2.6725	416,8	227,9	272,9	269,7	0,07
693.4156@2.0512	4188,0	7639,9	580,9	1871,5	0,07
Ala-Lys-Thr-Val	460,2	488,2	1602,4	2937,3	0,07
Arg-Lys-Phe-Arg	4933,9	8803,4	768,9	2508,6	0,07
759.4549@2.0927	1984,5	3440,5	365,1	871,8	0,07
Triethanolamine	2157,5	2844,2	22247,4	52576,0	0,07
Tiglylcarnitine	700,8	1182,4	12743,6	31566,7	0,07
Arg-Cys-Arg-Arg	663,9	344,7	487,4	222,7	0,08
715.9305@2.0625	2397,2	4182,2	435,2	1072,9	0,08
L-Arginine	6316,6	4747,3	22035,6	41044,7	0,08
Arg-Tyr-Arg-Arg	4400,0	7968,1	654,8	2205,7	0,08
[FA (8:1/5:2/7:0)] 5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	14813,2	30373,3	818,8	1635,9	0,08

2-(Ethylsulfonylmethyl)phenyl methylcarbamate	2749,5	1256,4	3555,3	1571,3	0,08
Ile-Pro	43978,3	38100,4	25656,0	16441,2	0,08
4-carboxy-2-hydroxypenta-2,4-dienoate	1778,5	950,4	2591,7	1877,5	0,08
526.655@2.1094	1318,8	2384,1	212,9	583,3	0,08
PS(O-36:2)	7794,2	2245,6	6286,7	3098,2	0,08
249.0477@1.2139	870,6	405,6	637,5	411,6	0,08
Propofol glucuronide	13293,3	27690,4	749,4	1531,6	0,08
242.7654@0.5969	941,3	473,8	1219,1	505,6	0,08
[FA dioxo(8:0)] 4,7-dioxo-octanoic acid	27856,9	18791,5	39794,1	23758,0	0,08
212.8387@0.6052	2038,3	377,7	2261,4	411,0	0,08
(R)-(E)-Sulforaphene	7074,9	4743,5	9863,8	5136,9	0,08
L-Methionine	972,2	1029,6	3322,1	6238,8	0,08
D-glutaminamide	4059,7	4403,6	7570,1	8114,4	0,08
160.8769@0.7887	604,0	385,7	840,2	463,3	0,08
Ondansetron	1895,0	2721,2	569,1	1589,6	0,08
12,20-Dioxo-leukotriene B4	967,0	833,3	579,9	353,8	0,09
Vitisidin A	12184,8	16324,7	35552,9	61544,9	0,09
14,19-Dihydroaspidospermatine	10698,3	4598,1	8209,5	4258,0	0,09
Phenindamine	4088,1	2967,3	2710,4	1363,5	0,09
Iopromide	445,5	662,3	5556,8	14247,0	0,09
Guanosine	1131,1	1315,6	449,0	1125,9	0,09
Lys-Thr-Val-Val	935,5	533,1	617,2	648,1	0,09
Glycylprolylhydroxyproline	2579,0	5515,1	47918,0	126937,4	0,09
Gabaculine	4366,9	2047,9	5550,0	2336,0	0,09
314.1263@2.4474	1973,5	1742,7	3306,6	3195,9	0,09
2-O-Benzoyl-D-glucose	2774,0	1382,6	3757,6	2286,6	0,10
Asn-Ile-Ile-Val	603,6	497,1	363,2	341,3	0,10

PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	682,8	348,4	504,7	297,5	0,10
4,5-Dihydro-2,4(5)-dimethyl-1H-imidazole	1561,6	1441,3	4573,9	8400,5	0,10
12-amino-dodecanoic acid	507,5	610,0	1145,2	1681,0	0,10
3-[4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2-propenal	19998,3	34808,8	4754,5	11128,7	0,10
Bis(2-furanylmethyl) disulfide	3608,2	1123,0	4524,5	2286,9	0,10
Thr-Cys-Pro	5400,3	9129,0	1356,3	3659,2	0,10
2-amino-2-deoxy-isochorismate	3842,5	2164,8	5397,6	3724,1	0,10
N-Desmethylaminopyrine	881688,1	1505517,2	225098,0	572414,4	0,10
853.8626@1.2137	345,5	500,7	2109,7	5096,9	0,11
Ile-Leu-Lys-Thr	869,4	511,1	629,9	355,3	0,11
Chlorin E6	446,0	270,8	314,3	227,7	0,11
Tetrahexosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1491,4	534,1	1764,4	521,3	0,11
3-Dehydroxycarnitine	96338,1	51770,5	125232,8	62509,6	0,11
1168.9565@1.9222	10402,3	25790,8	31,2	59,8	0,12
PC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	2347,5	1290,5	1612,8	1655,8	0,12
158.8795@0.7887	4145,4	2061,8	5133,2	1768,5	0,12
Ethyl 3,7-dimethyl-8-oxoocta-2,4,6-trienoate	1438,0	2644,9	375,3	577,9	0,12
1-Linoleoylglycerophosphocholine	34716,9	16342,2	26073,4	18587,7	0,12
L-Acetylcarnitine	686586,8	495960,1	951471,8	579683,7	0,12
2-iodophenol	6078,6	1238,9	6651,0	1004,6	0,13
2-bromoporphobilinogen	1076,1	373,2	892,1	368,0	0,13
Mannitol	17034,4	14890,9	10384,1	10765,1	0,13
Lansiumamide A	40952,6	54795,8	16181,2	42041,6	0,13

L-prolinylglycine	376,2	331,8	1065,8	2128,3	0,13
615.1698@3.2861	47872,1	27847,6	35785,8	19019,3	0,13
290.1383@3.3312	33940,3	88777,5	42,1	98,2	0,13
248.9614@1.9222	6149,5	16068,8	29,0	86,6	0,14
Ala-Leu-Phe-Arg	424,4	392,3	1555,0	3566,1	0,14
Leu-Lys-Thr-Thr	534,2	447,3	1973,5	4554,6	0,14
Biotin amide	1209,0	2289,2	291,4	1058,2	0,14
157.9992@0.9976	6442,7	9563,6	2593,3	4758,6	0,14
229.1188@1.0897	1727,5	3447,0	383,9	1269,8	0,14
LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2205,0	2186,4	1297,6	1344,3	0,14
Propafenone	2028,1	925,1	1552,9	1098,8	0,14
p-Fluorophenylalanine	11944,3	7799,9	8722,7	4828,7	0,14
N-ETHYLMETHACRYLAMIDE	59017,3	81357,7	125504,5	195546,0	0,14
615.4568@2.6911	1741,2	2041,8	5860,9	13210,1	0,15
156.8819@0.797	5158,5	2575,4	6296,5	2221,9	0,15
L-Alanine	12505,7	7596,2	18183,0	16755,7	0,15
1-18:2-2-18:3-phosphatidylethanolamine	978,1	1822,2	2308,8	3906,0	0,15
635.3366@1.8437	401,4	694,3	143,6	190,9	0,15
Cucurbitacin B	826,6	710,6	543,1	423,5	0,15
LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	10967,8	4637,5	8679,6	5397,8	0,15
OR-1855	146945,1	216830,9	60482,4	131039,8	0,16
250.1781@1.9264	3707,1	5103,1	6256,7	6176,3	0,16
314.1272@2.4407	4955,1	5495,5	9446,2	13741,4	0,16
1011.0305@0.8241	5576,2	2508,3	7387,4	5378,1	0,16
2-Acetyl-3-methylpyrazine	7049,2	5647,4	10621,1	10138,3	0,16
Uridine	1956,4	1374,3	1437,9	588,6	0,16
Linezolid	6250,9	16386,8	378,9	256,7	0,16
244.7626@0.5969	652,3	299,4	793,1	322,5	0,16
Prostaglandin E2	904,0	1191,3	436,4	738,7	0,16

Pantothenol	130673,0	273223,5	30236,5	111307,8	0,17
453.929@0.997	1870,9	827,9	2226,5	746,1	0,17
(E)-Urocanic acid	225510,5	164122,9	151752,3	169356,9	0,17
Lindheimerine	6380,3	2295,3	5097,5	3580,1	0,17
Palonosetron	8346,2	4257,5	6515,1	3966,6	0,17
Ala-Lys-Gln-Arg	640,8	353,5	484,7	358,8	0,17
661.5996@3.014	768,6	368,6	918,7	297,1	0,17
Prolylhydroxyproline	13801,2	30052,9	2998,5	12385,7	0,18
Borrelidin	2165,1	2049,9	1409,0	1068,9	0,18
L-Lactic acid	225510,2	126475,8	305204,3	241340,2	0,18
164.8531@0.6052	4683,5	874,3	4321,5	777,4	0,18
3-O-(beta-D-glucopyranosyl)-campest-5-en-3beta-ol	1110,9	670,8	1597,0	1557,8	0,18
N-Methylethanolaminium phosphate	55801,8	7677,3	58974,0	6923,2	0,18
TG(24:1(15Z)/24:0/22:2(13Z,16Z))	1470,2	1837,1	2613,4	3538,5	0,19
(2R,3R,4R)-2-Amino-4-hydroxy-3-methylpentanoic acid	1069,9	848,7	3815,3	9869,8	0,19
TG(14:0/15:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	3597,2	1999,3	2801,8	1663,9	0,19
221.0155@0.6822	900,5	352,6	1071,9	468,8	0,19
Adenosine monophosphate	2059,4	1160,8	1638,5	650,9	0,19
635.4159@3.0221	2325,3	1497,9	1546,4	2240,7	0,19
Benzyl sulfate	7270,4	9376,8	13673,5	20738,1	0,19
337.3352@2.8824	193970,7	256629,5	106368,9	88787,4	0,19
L-Cysteine, N-acetyl-S-(2-oxopropyl)	1211,9	1080,6	804,4	777,5	0,19
621.4014@2.7904	1782,2	779,4	1388,0	1151,6	0,20
Neurine	443446,4	200863,5	360989,4	198702,1	0,20
N-desmethyilmirtazapine	38522,8	96800,7	6741,9	28143,1	0,21
Metronidazole	3284,6	9708,4	43850,3	152692,9	0,21

179.8881@0.8065	1928,1	1474,4	2538,5	1551,7	0,21
[FA amino(8:0)] 3-amino-octanoic acid	91742,7	56842,3	117345,2	71973,6	0,21
Calcitriol	117,8	139,6	264,9	539,0	0,21
Biliverdin	10402,8	9497,3	15515,6	16291,8	0,21
I(-)	177,1	362,6	618,9	1646,4	0,21
Vitamin A	2091,8	3309,0	993,0	1623,4	0,22
Glu-Lys-Val-Ala	1206,1	1826,8	601,4	874,9	0,22
Hydroxydestruxin B	3728,6	2191,9	2790,1	2639,0	0,22
L-Phenylalanine	14071,2	8118,5	21293,3	26728,0	0,22
Gln-Lys-Lys-His	770,1	492,6	589,5	405,6	0,22
265.9417@1.0303	1845,7	636,8	2074,9	494,5	0,22
PI(18:2(9Z,12Z)/20:2(11Z,14Z))	554,6	446,3	404,6	257,7	0,22
1339.8778@3.0587	702,0	298,9	807,2	229,0	0,23
Lactosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1245,6	880,7	947,8	573,4	0,23
190.1208@1.6142	929,3	740,1	681,3	462,0	0,23
5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil	2070,6	1617,2	1493,9	1300,8	0,23
Lys-Val-Gln	397,0	591,9	2558,8	8640,3	0,23
Ornithine	1288,2	880,8	1757,4	1591,4	0,24
3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene	6300,6	10558,8	2993,2	4209,6	0,24
(2S,4R)-4-(9H-Pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-1,2,4-butanetriol	1171,8	1015,6	835,3	623,9	0,24
Ala-Lys-Thr-Pro	519,8	435,5	378,2	251,6	0,24
589.9029@0.9804	2095,7	963,5	2478,7	1084,8	0,24
Narciclasine	1824,2	789,2	2221,4	1344,6	0,24
613.1739@3.2837	2613,0	1592,2	2077,2	1145,3	0,25
2-(3-Hydroxypropoxy)propan-1-ol	9703,8	8733,8	12844,9	7954,2	0,25
PS(26:0))	7540,3	5645,0	5666,2	3941,8	0,25

261.8238@0.6302	1841,5	332,6	1984,8	452,1	0,25
Trigonelline	13500,3	30568,0	25925,4	37638,2	0,25
D-erythro-L-galacto-Nonulose	1242,8	730,0	1021,1	324,9	0,25
1-Octadecanol, 2-azido-3,4-bis(phenylmethoxy)-, (2S,3S,4R)	796,6	1339,5	379,8	717,6	0,25
223.8384@0.6302	3168,8	1243,3	3638,1	1343,9	0,26
Scutianine F	1865,1	1652,2	1338,6	1057,5	0,26
Homocysteine	4301,0	2959,1	5397,4	3113,3	0,26
Ricinine	5871,1	13963,6	1901,1	2067,2	0,26
128.8779@0.6218	1775,1	665,5	1575,6	308,2	0,26
L-Lysine	928,7	946,2	12893,8	51139,7	0,26
PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1338,5	514,7	1106,5	796,8	0,26
3-Hydroxy-2-naphthoate	7588,3	4492,9	9320,4	5268,2	0,27
α-monofluoromethyl- agmatine	4608,0	3013,9	5930,7	4496,2	0,27
[FA dimethyl,amino,trihydrox] 1- dimethylamino-9S,11R,15 S-trihydroxy-5Z,13E- prostadiene	853,9	971,1	544,8	688,7	0,27
Heterodendrin	2889,5	1970,3	2239,4	1598,4	0,27
234.1117@1.5233	6391,3	4637,8	4607,8	5599,7	0,27
180.8485@0.6052	6958,9	1171,6	6598,0	787,2	0,28
674.6688@2.8812	2058,9	2427,1	1346,2	1337,7	0,28
3-O- Sulfogalactosylceramide (d18:1/22:0)	884,5	958,6	589,4	677,4	0,28
L-Serine	2765,3	3525,0	1715,6	2227,6	0,29
His-Leu-Val-Val	3027,4	7618,3	926,1	2872,5	0,29
Arg-Met-Gly-Pro	1329,8	1164,9	808,8	1961,1	0,29
Calcidiol	14812,8	8419,1	12388,5	4922,8	0,30
547.8309@3.7685	244,9	325,4	152,3	179,0	0,30

488.8096@2.0655	1674,8	4209,9	559,0	983,4	0,30
591.3713@2.3886	1749,7	2453,7	3037,3	5218,2	0,30
Cimifugin	25832,9	98729,6	171,4	160,2	0,30
178.1204@1.3771	3990,0	2033,7	4686,6	2167,0	0,30
[FA hydroxy(18:1)] 17-hydroxy-9Z-octadecenoic acid	348,8	451,3	1079,7	3339,2	0,30
96.0326@1.0666	42705,1	17416,3	48839,6	19748,5	0,30
Ala-Lys-Pro-Ser	6049,7	21173,5	607,8	736,2	0,31
262.8207@0.614	4717,1	902,5	4444,8	697,2	0,31
Ala-Lys-Ala-Arg	2531,8	5951,4	928,3	2448,1	0,31
N-Methylpyridinium	999,5	2058,3	4175,6	14712,9	0,31
192.8657@0.6552	3062,3	1029,8	2750,5	819,7	0,31
Spirasine I	1017,8	620,6	809,7	657,5	0,31
5-Oxo-2(5H)-isoxazolepropanenitrile	64304,8	62027,1	43637,0	64976,9	0,31
Arg-Lys-Val-Ser	4720,8	13249,0	1284,6	3348,3	0,31
565.3365@2.6809	2217,5	1301,6	1786,6	1344,5	0,31
Campest-4-en-3-one	1542,1	3422,8	3573,1	8764,5	0,31
His-Lys-Lys-Val	9379,3	32914,8	1029,1	1884,5	0,31
657.89@0.9803	1468,4	787,1	1711,2	687,2	0,31
[FA hydroxy(18:0)] 9,12-dihydroxy-octadecanoic acid	852,5	627,8	1097,7	913,0	0,31
225.8349@0.6302	2956,5	1335,1	3369,6	1187,2	0,31
Cholesta-3,5-dien-7-one	788,8	453,5	643,3	445,1	0,31
645.6056@3.1953	2300,8	1084,4	1955,2	1046,6	0,31
605.8768@1.0053	1404,1	437,2	1542,5	417,8	0,32
Ala-Ala-Asn-Pro	403,0	823,8	169,5	553,0	0,32
PE(27:1)	1828,7	4069,4	3669,9	7571,6	0,32
B-Norcholest-4-en-3-one	5876,1	6046,3	10235,1	20000,0	0,32
129.9669@1.0219	21485,9	6578,3	23532,4	6268,7	0,32
243.0597@0.7052	8257,5	6317,2	6396,4	5218,1	0,33

[PC (16:1)] 1-(9E-hexadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	12558,9	8136,8	9937,1	8609,6	0,33
594.4876@2.7625	643,7	341,9	773,2	497,5	0,33
Ile-His	930,6	269,7	800,0	568,7	0,33
N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	4173,0	4695,3	2904,2	2950,5	0,33
Ile-Leu-Lys-Met	1480,0	1245,5	2437,2	4545,8	0,34
(-)-Aspidospermine	816,3	833,3	598,9	436,1	0,34
465.3692@2.7076	1969,2	4262,6	3609,4	6676,8	0,34
GlcCer(d18:2/20:0)	370,2	268,2	285,2	296,0	0,34
243.0722@0.6888	4253,9	1964,9	4825,1	1762,5	0,35
Triricinolein	1257,3	1092,0	1878,1	2923,5	0,35
208.1311@1.4042	27226,4	10864,2	32339,2	23082,0	0,35
SM(d34:1)	12937,7	7176,4	10364,3	10304,5	0,35
192.1365@1.5704	8300,4	5614,3	10192,4	7241,9	0,35
ε-aminocaproamide	1036,2	1439,0	7822,6	35246,4	0,36
Arg-Lys-Lys-His	1167,9	1057,5	896,8	657,6	0,36
5-Deoxyribose-1-phosphate	1158,2	930,1	1671,6	2468,2	0,36
2-hydroxydesipramine	6389,2	8298,0	9122,5	10692,9	0,36
SM(d18:1/24:0)	666,7	366,4	557,0	392,5	0,37
[FA amino(16:0)] hexadecanoic acid	18834,4	74778,8	1918,2	3184,7	0,37
199.1573@2.4151	806,5	2048,4	337,1	471,8	0,37
Citrulline	2377,5	2157,3	5147,4	14632,0	0,37
(Cyclohexylmethyl)-pyrazine	16822,2	6336,9	18519,9	5320,0	0,37
58.9837@0.793	10389,6	7789,9	12372,5	5626,6	0,38
565.8809@0.9513	1386,4	432,1	1280,7	264,9	0,38
361.9188@0.9524	2396,2	807,4	2607,9	654,4	0,38
903.5797@2.6004	622,9	373,7	513,5	405,7	0,38
Hydroxypropyl-Methionine	9613,0	10384,4	12375,1	8911,6	0,38

L-Carnitine	1521298,5	965805,0	1774062,4	796823,4	0,38
[SP (3:0)] sphinga-4E,8E,10E- trienine	32414,9	122502,5	5687,9	9964,3	0,38
N-Desalkyl flurazepam	5744,1	3029,3	6576,9	2883,4	0,38
L-Glutamic acid	1095,1	849,4	2062,0	5333,7	0,39
1,3-Bis(2,3,5- trihydroxyphenyl)propane- 1,3-dione	2694,1	2001,8	2166,5	1817,6	0,39
202.8097@0.5802	86296,4	5779,0	84644,4	6475,7	0,40
Potassium 2-(1'-ethoxy) ethoxypropanoate	5809,6	3929,6	6798,6	3189,2	0,40
13-HDoHE	2542,9	3195,3	1732,0	2822,3	0,41
979.9826@0.7939	6418,8	5248,2	7631,4	3453,8	0,41
D-Glucose	15970,0	12991,7	12504,7	13631,2	0,42
194.9581@0.8272	1074,2	813,4	1261,1	543,5	0,42
126.8809@0.6219	2640,9	1061,1	2397,4	802,1	0,43
Glyceric acid	5684,3	7644,0	4066,6	4001,4	0,43
L-Tryptophan	2189,4	1209,4	2636,2	2380,9	0,44
PC(36:2)	4477,2	3596,3	5769,8	6819,3	0,44
1 β ,25-dihydroxy-2 β -(3- hydroxypropoxy)vitamin D3 / 1 β ,25-dihydroxy-2 β - (3-hydroxypropoxy)chole- calciferol	1000,4	1705,6	639,3	963,3	0,44
Prolyl-Alanine	3758,5	3389,3	4830,8	5403,3	0,44
133.9955@0.8123	892,7	272,2	1000,5	599,0	0,44
Camoensine	2634,1	1320,6	3084,5	2421,4	0,45
Na-L-Glutamyl-L-aspartic acid	731,3	273,2	661,3	312,8	0,45
Farnesylcysteine	1341,7	665,8	1173,4	746,3	0,45
Histidinyl-Proline	653,1	671,8	833,1	847,6	0,45
PE(35:0)	3306,3	2245,8	2749,3	2448,5	0,46
Lys-Asn-Pro	2141,7	5106,6	1157,9	1994,1	0,46
469.9029@1.0137	1348,4	299,1	1424,8	353,7	0,46
633.8681@0.9514	1326,7	509,9	1226,4	252,5	0,46

L-Hexanoylcarnitine	2441,9	2054,4	1988,2	1731,5	0,46
207.0479@0.9592	689,5	230,2	741,9	215,5	0,47
Buchananine	2329,7	2990,4	1775,5	946,8	0,47
280.0471@0.7719	1211,5	683,3	1380,4	836,1	0,48
178.8526@0.6053	2686,2	521,7	2581,1	376,2	0,48
N-(2-hydroxytetracosanoyl)-4,8-sphingadienine	615,2	310,5	688,3	346,5	0,48
940.1541@3.0642	7850,6	2602,0	8383,2	2007,0	0,48
Butorphanol	10144,5	4130,6	9021,4	6065,1	0,48
245.075@0.6907	6816,5	6052,5	5278,3	7910,8	0,49
313.2102@2.0309	2765,4	1965,6	3550,2	4926,4	0,49
Arg-Trp-Pro-Tyr	111815,2	125686,5	87569,8	77326,1	0,49
[FA (30:0)]	3628,4	1598,5	4073,7	2464,1	0,49
N-(eicosanoyl)-1-beta-glucosyl-pentadecasphing-4-enine	390,2	349,0	307,0	406,2	0,49
Pyroglutamic acid	12184,0	8871,8	15117,2	17621,4	0,49
491.3947@2.7823	763,7	1772,4	429,8	990,9	0,49
(2R*,3R*)-1,2,3-Butanetriol	18493,7	29811,6	13062,0	14182,6	0,49
Pro-Thr-Val-Val	7097,3	12376,6	10412,5	18530,4	0,50
2-(m-Chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	2807,3	999,2	3014,0	877,0	0,50
135.0899@1.1729	4779,4	4457,9	3937,4	3070,3	0,51
4-(Dodecylsulfanyl)-4-oxobutanoic acid	2842,5	5869,7	4634,6	11146,2	0,51
N-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-L-serine	1660,5	1023,1	1949,7	1766,2	0,51
83.9614@0.9826	19040,3	6533,7	20369,8	6135,4	0,51
Arg-Thr-Arg-Arg	564,0	833,9	416,2	466,2	0,52
Lansiumamide C	130,5	224,9	256,1	896,4	0,52
PS(38:3)	1229,0	348,0	1075,8	1064,9	0,52
LysoPC(22:2(13Z,16Z))	2772,7	6978,0	4323,0	8302,3	0,52

222.1468@1.5928	3133,4	2123,7	3598,8	2535,2	0,53
412.6602@0.5969	44009,8	11113,3	41798,7	10718,0	0,53
Chamazulene	886,0	1310,4	635,3	1149,1	0,53
258.8269@0.6057	78601,3	10224,9	76723,9	8200,2	0,54
D-Sedoheptulose 7-phosphate	2849,2	1483,2	3136,0	1387,4	0,54
641.2406@2.6896	810,5	587,3	687,4	679,8	0,54
Polyethylene glycol	3258,4	5676,4	5514,7	16525,3	0,54
256.83@0.6057	77314,1	9945,9	75504,8	8210,9	0,54
Arg-Leu-Leu-Phe	1408,9	1906,5	1938,8	3588,7	0,54
568.3559@2.9308	365,8	377,3	301,9	244,0	0,55
161.8499@0.6552	66747,4	15950,8	63819,5	14417,0	0,55
delta-Guanidinovaleric acid	2882,7	1383,2	3141,7	1347,5	0,55
Guanidine	16963,1	13166,0	14977,5	5015,6	0,56
715.6098@3.1629	1352,5	1469,7	1621,5	1448,1	0,57
3,6,9,12,15,18,21-Heptaaxatetracontan-1-ol	242,4	306,9	301,3	338,9	0,57
Ala-Leu-Lys-Ala	2448,5	1599,2	2045,8	2842,7	0,57
N-acetylphospho-phosphonoacetyl-L-ornithine	4845,6	3748,5	4008,4	5561,3	0,57
(+)-O-Methylarmepavine	1668,8	770,8	1516,6	920,4	0,57
531.3776@2.7142	2057,3	5453,1	3098,2	6083,6	0,57
Cytochalasin Opho	774,6	785,2	1041,4	2079,4	0,57
664.3413@2.9568	2863,6	3242,9	2352,5	2046,4	0,57
5-Ethyl-4-methyl-2-octylthiazole	39141,6	21633,7	43977,2	32841,0	0,57
GYKI 52466	9136,2	5258,9	10060,2	4953,2	0,57
Ethylmorphine	1788,9	3415,8	1284,3	1560,7	0,58
Fetidine	677,7	558,9	778,9	575,3	0,58
175.1221@1.3509	9640,7	5804,4	10768,7	6994,3	0,58
TG(15:0/16:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	735,3	806,0	603,8	626,9	0,58

Hypoxanthine	17024,5	11985,4	20583,0	27620,9	0,58
260.8238@0.6063	28312,8	3861,9	27715,5	2524,7	0,58
Hexazinone	22617,4	13802,4	25780,3	22668,2	0,58
(S)-2,3-Epoxy-squalene	529,3	1028,4	809,1	2156,5	0,58
414.6571@0.5969	46011,5	10638,9	44002,5	12554,8	0,58
725.877@0.9886	1078,2	709,1	1193,6	578,6	0,58
Ile-Lys-Ala-Gly	11401,5	19034,8	15838,5	32395,8	0,59
[FA oxo,hydroxy(5:1/5:0)] (1S,2R)-3-oxo-2-(5'-hydroxy-2'Z-pentenyl)-cyclopentaneacetic acid	48593,7	37951,4	42868,9	23621,6	0,59
14,19-Didehydrocondyfolan	485513,1	371808,1	563256,1	545530,4	0,59
194.823@0.5802	39319,0	3018,3	38756,9	3592,5	0,59
Astrocasine	1045,5	579,7	932,2	766,6	0,59
257.8298@0.6299	5598,5	812,8	5465,8	733,4	0,60
Malathion monocarboxylic acid	2067,9	841,7	1921,8	889,8	0,60
2-Hydroxybutyric acid	6054,5	5178,3	5283,1	3509,7	0,60
519.5002@3.0198	1267,1	332,5	1327,9	396,7	0,60
661.1731@3.2922	3019,2	1499,5	2772,3	1413,6	0,60
240.768@0.5969	609,2	377,5	663,9	239,9	0,60
Ergothioneine	2543,8	1227,7	2890,9	2955,2	0,61
Tetrahexosylceramide (d18:1/22:0)	657,5	215,9	621,5	230,4	0,61
Strobamine	1006,2	1185,9	836,8	811,3	0,61
513.5124@2.9373	648,7	271,6	833,1	1763,7	0,62
Asymmetric dimethylarginine	2099,9	2114,8	2457,6	2448,9	0,62
215.888@0.6636	2476,2	1776,6	2237,1	1013,9	0,62
(-)-Tortuosamine	1054,8	604,5	960,6	593,1	0,62
Ala-Phe-Val-Gly	474,3	432,1	562,4	714,6	0,63
N-(2-hydroxyhexacosanoyl)-4,8-sphingadienine	131,6	110,4	114,4	112,1	0,63

907.6177@2.8142	2167,4	1216,6	1998,5	912,3	0,63
p-Phenolsulfonic acid	3756,8	7238,2	4811,5	6784,5	0,64
Pyruvic acid	3490,2	2383,5	3806,7	1684,3	0,64
11-amino-undecanoic acid	3481,6	6031,6	2693,1	3998,8	0,64
227.0649@0.6929	1324,3	825,6	1451,9	903,7	0,64
2,3-Dihydroxy-2,4-cyclopentadien-1-one	946,3	648,5	863,6	402,9	0,65
182.8453@0.6051	5193,2	1275,5	5365,1	992,4	0,65
5-Acetyl-2,4-dimethylloxazole	35018,1	8353,8	36331,0	9705,1	0,65
142.0743@0.8457	13944,8	26200,2	10857,0	9937,4	0,65
203.8099@0.5802	2185,5	293,9	2227,8	289,9	0,65
Isopiperolein B	9249,9	13344,1	11434,6	17437,9	0,65
L-Threonine	3851,1	6004,0	3100,9	3808,8	0,65
Propionylcarnitine	78225,1	58852,1	70388,5	47942,2	0,65
Metenamine	59334,4	109514,8	40958,5	151579,7	0,65
N-Hexadecanoylpyrrolidine	3476,9	2649,4	3162,7	1402,4	0,66
2alpha-Methyl-17beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-5alpha-androstan-3-one	461,0	647,9	586,1	1149,0	0,66
213.173@2.4747	3707,5	4759,4	4387,5	4976,6	0,66
Glycerophosphocholine	44560,4	31893,4	40582,1	22641,7	0,66
N-(1-Deoxy-1-fructosyl)valine	1046,9	1050,2	911,0	852,6	0,66
Benzaldehyde glyceryl acetal	1026,5	823,2	1216,9	1891,4	0,66
Uric acid	4785,9	4352,8	5352,9	3772,4	0,67
Methylguanidine	3692,1	4166,6	3190,1	2853,2	0,67
Ile-Leu-Arg-His	2145,6	2312,2	1888,7	1007,6	0,67
Anatalline	865,1	1041,3	1030,7	1442,8	0,67
[SP] (3'-sulfo)Galbeta-Cer(d18:0/2-OH-24:0)	118,3	120,4	143,1	253,6	0,68

Guanosine, 2'-deoxy-8- ((4,6-dimethyldipyrido(1,2- a:3',2'-d)imidazol-3- yl)amino)	242,3	168,9	272,7	294,8	0,68
PE(17:0)	3678,5	1983,4	4133,3	4816,7	0,68
521.9159@0.9887	2095,7	977,4	2214,3	780,0	0,68
Ebastine	301,2	194,5	276,0	203,6	0,69
FA oxo(14:2) cyclopentanebutanoic acid	4682,3	2667,1	5111,9	4259,5	0,69
PE(22:1(13Z)/15:0)	42044,3	39167,3	37020,3	41793,9	0,70
Avadharidine	333,5	473,7	397,9	575,6	0,70
89.9697@0.9622	57822,3	20188,8	59960,5	12386,1	0,70
N-(2-Hydroxyethyl)- morpholine N-oxide	566,0	1211,5	419,4	1206,0	0,70
597.4828@2.9323	457,0	618,9	391,2	420,4	0,71
Salmeterol	3231,5	1452,3	3000,4	2439,6	0,71
497.8935@0.952	1702,5	625,1	1765,8	362,1	0,71
254.8348@0.6302	4645,6	778,2	4557,4	721,4	0,71
PC (40:5)	2883,9	1405,8	2701,1	1772,5	0,72
416.6541@0.5975	28216,5	5071,6	27526,9	7012,5	0,72
Pyrimidine 5'-nucleotide	4848,2	3954,9	4405,1	3681,2	0,72
Pindolol	7957,3	4081,7	8435,7	4324,1	0,72
190.1424@1.2388	800,1	862,7	896,9	827,3	0,72
3-(1-Hydroxymethyl-1- propenyl)pentanedioic acid	1019,1	376,7	968,0	548,9	0,73
167.8413@0.597	2291,6	604,6	2224,6	595,5	0,73
749.4002@3.5227	730,7	612,1	667,4	513,3	0,73
Creatinine	928542,3	365877,9	893328,0	237420,2	0,73
259.8268@0.622	5577,3	1054,7	5471,8	816,0	0,73
Glycine	860,9	607,9	940,8	882,9	0,73
2-Methylhexanoyl-CoA	233,1	661,2	173,2	337,0	0,73
Asp-Asp-Gln-His	636,5	1041,6	497,0	1641,5	0,74

PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	662,8	305,1	618,2	548,0	0,74
429.9061@0.952	2035,5	702,3	2098,6	453,3	0,75
N-Butyl-beta-carboline-3-carboxylate	2356,0	3370,1	2048,4	2398,1	0,75
PC(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/20:2(11Z,14Z))	8332,6	4337,6	7934,0	3634,0	0,76
342.2887@2.7849	40260,4	38661,8	46813,4	94636,7	0,76
Casimiroin	1988,7	5396,6	2822,1	11785,1	0,76
165.8439@0.6383	18775,1	4373,4	18352,7	4697,0	0,77
163.8469@0.647	60513,1	13491,9	59285,8	13164,7	0,77
Creatine	789372,0	429289,6	754736,6	307161,4	0,78
Slaframine	19307,8	6833,9	19814,5	4092,6	0,79
151.9486@0.9755	2598,6	831,2	2668,4	788,6	0,79
N-Methylspido-spermatidine	18169,1	9792,3	19317,0	17666,6	0,79
80.9809@0.9861	700,5	355,3	669,5	389,8	0,79
Conocurvone	3008,8	3029,8	2778,5	2399,8	0,80
942.2036@3.1643	196,4	350,4	172,2	187,0	0,80
Niacinamide	35343,6	13966,2	36301,7	9722,8	0,81
184.8424@0.6136	1686,2	321,7	1709,1	285,3	0,82
Tetranor-PGF1alpha	1567,4	3560,5	1804,0	2752,2	0,82
L-Isoleucine	8811,8	18349,2	7582,9	14753,5	0,82
138.0142@0.7135	144,0	196,5	128,9	226,2	0,82
190.8668@0.6635	17146,1	5866,0	16755,6	4691,0	0,82
PS(O-38:2)	1965,7	541,9	1916,6	843,1	0,82
253.1889@1.9752	5249,0	4061,9	5593,8	5787,8	0,82
guanidovaleramide	872,0	1759,1	742,7	1972,1	0,83
Arg-Lys-Lys-Ser	753,9	346,8	726,6	456,0	0,83
3-Buten-1-amine	5337,3	2219,6	5567,2	4490,4	0,83
520.5006@3.0243	289,7	211,1	276,9	160,4	0,83
188.8693@0.6636	28457,5	9002,2	27917,7	7083,2	0,84
Glu-Cys-Cys	5411,9	6147,4	5817,0	7618,0	0,85

Epinephrine	8206,5	6216,1	8528,8	4323,2	0,86
Inosine	9107,7	6566,2	8676,6	8894,9	0,86
196.819@0.5802	764958,1	61072,0	761522,6	60998,0	0,86
Hydroxybutyrylcarnitine	8037,2	10806,5	7419,9	11197,9	0,86
159.8542@0.6385	3666,7	985,3	3722,9	1025,3	0,86
385.942@0.997	1899,1	645,7	1865,4	532,0	0,86
N3-methylthymine	45729,5	85376,0	39458,6	151446,0	0,87
869.1906@3.0642	66,7	161,9	74,8	135,5	0,87
2,3-dichloromaleylacetate	12300,2	5313,0	12535,4	3739,7	0,88
Alpha-D-Mannoheptulopyranose	1820,6	1535,8	1888,2	1115,1	0,88
78.9829@0.9864	11492,3	2762,9	11356,7	2818,1	0,88
201.8128@0.5802	8892,6	711,5	8850,4	1083,2	0,88
162.8567@0.6052	4688,0	559,2	4658,9	700,3	0,88
Cholesterol sulfate	4382,3	2721,0	4502,8	2423,0	0,88
[FA amino(4:0)] 2-amino-4-cyano-butanoic acid	48796,3	54733,0	50864,7	23674,3	0,89
186.8533@0.7803	988,7	765,2	1020,3	574,9	0,89
DG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:2(11Z,14Z)/0:0)	331,5	336,6	345,7	291,2	0,89
157.9568@0.9599	11179,4	3636,7	11312,3	2080,6	0,89
333.9289@1.0303	1694,2	514,1	1673,7	420,9	0,89
PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	2874,5	1693,1	2944,0	1760,1	0,90
Tropium chloride	1375,5	1683,8	1329,6	1120,2	0,92
805.2011@2.9726	125,0	346,0	134,0	257,6	0,93
Ethyl aconitate	3379,3	1811,5	3320,8	2396,9	0,93
Ile-Leu-Lys-Tyr	2432,1	2189,5	2375,9	2031,4	0,93
Glycerol 1-(9Z-octadecenoate) 2-tetradecanoate 3-phosphate	1662,9	1149,6	1632,7	1280,4	0,94
7-(Methylthio)heptanenitrile	14125,4	4155,5	14222,0	3749,7	0,94

Chenodeoxycholic acid sulfate	1021,1	2146,9	1079,5	3008,7	0,94
204.8065@0.5802	6600,9	767,7	6583,6	758,1	0,94
93.9353@0.5636	5370,1	1356,9	5341,8	1107,0	0,94
Argenteane	1094,9	713,5	1109,2	572,0	0,95
Tolbutamide	1678,6	1245,0	1654,5	1018,2	0,95
977.8176@2.9989	89,1	69,2	90,7	94,8	0,95
220.8544@0.6492	3091,3	1791,2	3048,7	2860,4	0,95
Biperiden	3831,3	1741,3	3873,9	3251,7	0,96
L-lysine-p-nitroanilide	6474,3	3882,6	6406,7	4250,3	0,96
868.1897@3.0636	101,6	303,5	97,2	196,3	0,96
204.8519@0.6052	3693,9	818,7	3685,4	425,5	0,97
9-Carboxymethoxy-methylguanine	10204,6	4732,9	10273,2	7011,0	0,97
206.8476@0.6135	59168,7	8632,7	59075,7	7025,0	0,97
870.1882@3.0578	72,5	224,8	74,7	124,4	0,97
Ammonium lactate	4409,0	764,3	4405,8	1234,3	0,99
Prop-2-en-1-yl 4-(2-tert-butylhydrazinylidene)pentanoate	4027,4	7646,1	4006,6	5539,9	0,99
166.8492@0.5968	1689,7	412,7	1690,5	367,5	0,99
197.9545@1.0216	1409,8	435,1	1410,3	402,6	1,00
123.9155@0.9788	3244,8	1251,2	3245,1	999,5	1,00
740.3473@2.9573	1633,0	2144,6	1632,6	1387,7	1,00

1.3. Vergleich zwischen Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe C

Tabelle III: Metabolite ohne statistisch signifikante Mittelwertdifferenz im Vergleich von Versuchsgruppe A1 und Kontrollgruppe C					
Metabolite	Versuchsgruppe A1		Kontrollgruppe C		p-Wert
	Mean	SD	Mean	SD	
190.1424@1.2388	800,1	862,7	343,9	318,3	0,05
Arg-Lys-Lys-Cys	995,3	1298,0	323,4	305,7	0,05
244.2155@3.7467	551,8	569,6	251,6	276,6	0,06
361.9188@0.9524	2396,2	807,4	1970,2	405,9	0,06

Arg-Lys-Lys-Ser	753,9	346,8	559,3	258,9	0,06
Glu-Lys-Val-Ala	1206,1	1826,8	289,2	411,5	0,06
N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	4173,0	4695,3	1646,7	2862,6	0,06
234.1117@1.5233	6391,3	4637,8	3419,3	5312,0	0,06
N-Desmethylaminopyrine	881688,1	1505517,2	129179,0	450978,2	0,06
Hexazinone	22617,4	13802,4	15174,7	9181,6	0,06
3-Hydroxy-2-naphthoate	7588,3	4492,9	10643,3	6138,1	0,06
635.3366@1.8437	401,4	694,3	64,6	121,1	0,06
497.8935@0.952	1702,5	625,1	1382,7	330,5	0,06
661.1731@3.2922	3019,2	1499,5	2134,3	1497,8	0,06
3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene	6300,6	10558,8	1254,0	623,3	0,07
853.8626@1.2137	345,5	500,7	106,3	37,8	0,07
[FA (8:1/5:2/7:0)] 5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	14813,2	30373,3	448,8	655,6	0,07
Ala-Ala-Asn-Pro	403,0	823,8	15,4	57,4	0,07
[DG(8:0/8:0)] 1-(8-[5]-ladderane-octanyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerol	1015,9	856,1	567,2	603,7	0,07
Pyruvic acid	3490,2	2383,5	2276,0	1436,9	0,07
Epsilon-aminocaproamide	1036,2	1439,0	337,5	567,8	0,07
3-[4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2-propenal	19998,3	34808,8	3341,8	10456,9	0,07
I(-)	177,1	362,6	7,0	21,2	0,07
Potassium 2-(1'-ethoxy)ethoxypropanoate	5809,6	3929,6	3864,9	1944,7	0,07
615.1698@3.2861	47872,1	27847,6	33386,2	19347,5	0,07
Beta-Carboline	7662,1	5890,2	4583,0	4220,3	0,07
Propofol glucuronide	13293,3	27690,4	400,3	645,2	0,07

Biotin amide	1209,0	2289,2	141,3	255,7	0,07
Borrelidin	2165,1	2049,9	1205,3	578,6	0,08
Hexanoylcholine	179,5	286,8	407,6	542,4	0,08
OR-1855	146945,1	216830,9	39707,8	124570,5	0,08
337.3352@2.8824	193970,7	256629,5	75295,6	58041,5	0,08
N-(2-Hydroxyethyl)-morpholine N-oxide	566,0	1211,5	12,6	1,8	0,08
TG(24:1(15Z)/24:0/22:2(13Z,16Z))	1470,2	1837,1	2491,1	1798,9	0,08
314.1272@2.4407	4955,1	5495,5	2308,4	2884,9	0,08
(R)-(E)-Sulforaphene	7074,9	4743,5	4708,3	3173,5	0,08
229.1188@1.0897	1727,5	3447,0	170,9	204,8	0,08
192.8657@0.6552	3062,3	1029,8	2561,7	591,8	0,08
Ethylmorphine	1788,9	3415,8	250,0	373,8	0,08
Pantothenol	130673,0	273223,5	8359,6	11745,0	0,08
178.1204@1.3771	3990,0	2033,7	5198,5	2462,8	0,09
(+)-O-Methylarmepavine	1668,8	770,8	1301,5	428,0	0,09
Ala-Lys-Ala-Pro	1105,2	704,6	776,7	325,0	0,09
138.0142@0.7135	144,0	196,5	51,6	102,1	0,09
Ala-Lys-Thr-Pro	519,8	435,5	796,8	611,9	0,09
Prolylhydroxyproline	13801,2	30052,9	581,0	1022,2	0,09
Asymmetric dimethylarginine	2099,9	2114,8	1140,5	809,1	0,09
429.9061@0.952	2035,5	702,3	1697,5	472,8	0,09
189.1557@1.087	788,7	322,5	620,8	298,0	0,09
Phytosphingosine-1-P	2103,2	2892,5	845,7	378,3	0,09
513.5124@2.9373	648,7	271,6	458,2	465,1	0,09
Arg-Lys-Tyr-Arg	642,4	854,5	262,5	302,2	0,09
[FA amino(8:0)] 3-amino-octanoic acid	91742,7	56842,3	66222,4	25537,7	0,10
157.9992@0.9976	6442,7	9563,6	2151,4	4497,8	0,10
164.8531@0.6052	4683,5	874,3	4263,5	643,2	0,10
Tropium chloride	1375,5	1683,8	643,9	544,0	0,10

78.9829@0.9864	11492,3	2762,9	12732,1	1465,7	0,10
Hydroxybutyrylcarnitine	8037,2	10806,5	3392,0	3528,2	0,10
Tetrahexosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1491,4	534,1	1246,2	337,3	0,10
Homocysteine	4301,0	2959,1	5731,1	2384,1	0,10
PS(O-36:2)	7794,2	2245,6	6692,6	1932,0	0,11
Guanidine	16963,1	13166,0	11408,9	3035,5	0,11
Lys-Thr-Val-Val	935,5	533,1	1249,3	723,1	0,11
Ile-Lys-Ala-Gly	11401,5	19034,8	3576,9	3687,4	0,11
Butorphanol	10144,5	4130,6	8212,7	3230,4	0,11
Ornithine	1288,2	880,8	906,2	486,5	0,12
Lansiumamide C	130,5	224,9	332,9	588,4	0,12
Isopiperolein B	9249,9	13344,1	3792,5	3596,0	0,12
L-lysine-p-nitroanilide	6474,3	3882,6	4816,7	1980,7	0,12
613.1739@3.2837	2613,0	1592,2	1914,9	985,0	0,12
83.9614@0.9826	19040,3	6533,7	21961,6	4520,5	0,12
PS(26:0))	7540,3	5645,0	5106,7	3319,2	0,12
Pro-Thr-Val-Val	7097,3	12376,6	2142,4	2404,6	0,12
PE(35:0)	3306,3	2245,8	2060,2	2959,6	0,12
Actinonin	2624,9	1545,9	1976,2	762,0	0,12
Phenindamine	4088,1	2967,3	2801,6	1875,1	0,12
L-Threonine	3851,1	6004,0	1446,7	1652,1	0,12
guanidovaleramide	872,0	1759,1	179,0	171,5	0,12
N-desmethylmirtazapine	38522,8	96800,7	851,9	1324,6	0,13
Ergothioneine	2543,8	1227,7	3776,0	3822,1	0,13
645.6056@3.1953	2300,8	1084,4	1814,6	871,0	0,13
491.3947@2.7823	763,7	1772,4	74,1	254,4	0,13
Ala-Lys-Ala-Arg	2531,8	5951,4	230,9	483,6	0,13
4,5-Dihydro-2,4(5)- dimethyl-1H-imidazole	1561,6	1441,3	992,6	465,0	0,13
Conocurvone	3008,8	3029,8	4487,0	3215,6	0,13

[FA amino(4:0)] 2-amino-4-cyano-butanoic acid	48796,3	54733,0	27402,0	15863,6	0,13
290.1383@3.3312	33940,3	88777,5	81,9	102,9	0,14
9-Carboxymethoxy-methylguanine	10204,6	4732,9	8176,0	3632,7	0,14
1339.8778@3.0587	702,0	298,9	573,5	235,9	0,14
144.1009@1.195	10038,8	5389,1	7912,6	2628,5	0,14
Astrocasine	1045,5	579,7	787,0	521,8	0,14
Arg-Leu-Trp-His	318,8	270,9	205,3	193,1	0,14
(-)-Aspidospermine	816,3	833,3	500,1	240,3	0,14
280.0471@0.7719	1211,5	683,3	831,3	1033,9	0,15
Alpha-Linolenic acid	9814,1	14297,0	4285,4	6780,3	0,15
547.8309@3.7685	244,9	325,4	117,3	174,9	0,15
2-Hydroxybutyric acid	6054,5	5178,3	3958,8	3422,2	0,15
399.2813@2.3754	603,8	397,4	448,0	223,6	0,15
Anatalline	865,1	1041,3	457,4	589,2	0,15
N3-methylthymine	45729,5	85376,0	14548,5	15926,7	0,15
Z-Tyr-Leu-NHOH	792,9	402,4	628,2	292,0	0,16
His-Leu-Val-Val	3027,4	7618,3	273,3	657,2	0,16
190.1208@1.6142	929,3	740,1	1381,7	1339,1	0,16
PC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	662,8	305,1	517,1	359,0	0,16
Casimiroin	1988,7	5396,6	53,7	92,6	0,16
Linezolid	6250,9	16386,8	403,7	241,2	0,16
1168.9565@1.9222	10402,3	25790,8	1099,9	5460,0	0,16
L-Valine	698957,6	372449,2	851944,9	290905,1	0,16
740.3473@2.9573	1633,0	2144,6	2480,9	1424,3	0,16
Tetrahexosylceramide (d18:1/22:0)	657,5	215,9	563,9	205,6	0,16
Ethyl 3,7-dimethyl-8-oxoocta-2,4,6-trienoate	1438,0	2644,9	492,7	601,4	0,17
942.2036@3.1643	196,4	350,4	68,8	125,4	0,17

488.8096@2.0655	1674,8	4209,9	198,1	268,1	0,17
609.3254@2.8392	1038,7	850,4	701,5	631,9	0,17
123.9155@0.9788	3244,8	1251,2	3718,6	737,1	0,17
167.8413@0.597	2291,6	604,6	2056,4	428,1	0,17
Na-L-Glutamyl-L-aspartic acid	731,3	273,2	628,6	162,1	0,17
248.9614@1.9222	6149,5	16068,8	571,0	2775,5	0,17
Felodipine	29652,9	64707,6	7026,7	16110,5	0,18
Lys-Asn-Pro	2141,7	5106,6	382,3	504,1	0,18
L-prolinylglycine	376,2	331,8	617,6	810,7	0,18
N-(hexadecanoyl)-hexadecasping-4-enine-1-phosphoethanolamine	1388,3	811,0	1028,5	902,6	0,18
PC(38:5)	17380,3	10184,1	13123,4	9758,1	0,18
Tetranor-PGF1alpha	1567,4	3560,5	356,3	364,0	0,18
[FA (30:0)]	3628,4	1598,5	2721,2	2846,1	0,18
416.6541@0.5975	28216,5	5071,6	26035,9	5387,8	0,18
1-Pyrimidinylpiperazine	12021,7	3342,9	13554,7	4123,9	0,18
Ile-Leu-Lys-Met	1480,0	1245,5	1021,0	763,9	0,18
314.1263@2.4474	1973,5	1742,7	1320,8	1191,1	0,19
Ile-Leu-Tyr	516,4	692,5	273,2	304,4	0,19
Ala-Leu-Lys-Ala	2448,5	1599,2	3142,9	1786,7	0,19
Arg-Lys-Val-Ser	4720,8	13249,0	354,9	578,6	0,19
188.8693@0.6636	28457,5	9002,2	25306,0	4455,7	0,19
[FA dioxo(8:0)] 4,7-dioxo-octanoic acid	27856,9	18791,5	37190,7	28066,1	0,19
Neurine	443446,4	200863,5	354685,5	245060,1	0,20
Farnesylcysteine	1341,7	665,8	1112,0	327,8	0,20
Triethanolamine	2157,5	2844,2	12356,8	40415,6	0,20
L-Serine	2765,3	3525,0	1534,6	2101,2	0,21
412.6602@0.5969	44009,8	11113,3	39994,2	7979,1	0,21
414.6571@0.5969	46011,5	10638,9	41997,0	9332,1	0,21

3-(1-Hydroxymethyl-1-propenyl)pentanedioic acid	1019,1	376,7	886,5	251,1	0,21
Succinimide	836,4	730,4	1097,6	530,1	0,21
204.8065@0.5802	6600,9	767,7	6309,5	703,7	0,21
Calcitriol	117,8	139,6	226,8	415,5	0,22
p-Phenolsulfonic acid	3756,8	7238,2	1475,0	1692,9	0,22
TG(15:0/16:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	735,3	806,0	457,9	524,5	0,22
PC(36:2)	4477,2	3596,3	2946,0	4551,3	0,22
2-iodophenol	6078,6	1238,9	5614,0	1184,9	0,23
Prostaglandin E2	904,0	1191,3	403,0	1510,5	0,23
(S)-piperazine-2-carboxamide	17419,1	12178,4	13619,1	4490,4	0,23
Tripelennamine	6240,0	6823,7	9240,3	9614,4	0,23
Cholesterol sulfate	4382,3	2721,0	3193,5	3851,0	0,24
977.8176@2.9989	89,1	69,2	180,7	385,6	0,24
213.173@2.4747	3707,5	4759,4	2247,3	1756,0	0,24
135.0899@1.1729	4779,4	4457,9	3337,1	2691,6	0,24
N-Methylpyridinium	999,5	2058,3	1694,5	1583,9	0,24
2-hydroxydesipramine	6389,2	8298,0	3828,9	3755,6	0,25
Chlorin E6	446,0	270,8	343,3	296,5	0,25
128.8779@0.6218	1775,1	665,5	1563,3	421,5	0,25
14,19-Dihydroaspidospermatine	10698,3	4598,1	9287,0	2308,9	0,25
161.8499@0.6552	66747,4	15950,8	61247,3	14886,1	0,26
Pirimicarb	2187,0	3250,0	3485,5	4298,4	0,26
521.9159@0.9887	2095,7	977,4	1766,8	864,4	0,26
5-Ethyl-4-methyl-2-octylthiazole	39141,6	21633,7	49955,0	41554,6	0,26
186.8533@0.7803	988,7	765,2	1256,1	759,4	0,27
1-Octadecanol, 2-azido-3,4-bis(phenylmethoxy)-, (2S,3S,4R)	796,6	1339,5	412,4	485,0	0,27

His-Lys-Lys-Val	9379,3	32914,8	318,3	389,6	0,27
Spirasine I	1017,8	620,6	813,3	546,1	0,27
Metronidazole	3284,6	9708,4	624,4	882,2	0,28
1-18:2-2-18:3-phosphatidylethanolamine	978,1	1822,2	1624,2	1989,2	0,28
Buchananine	2329,7	2990,4	1499,3	735,5	0,28
203.8099@0.5802	2185,5	293,9	2087,5	272,8	0,28
[FA hydroxy(18:0)] 9,12-dihydroxy-octadecanoic acid	852,5	627,8	557,1	1147,3	0,28
L-Glutamine	7861,4	6286,9	9673,1	2992,4	0,28
192.1365@1.5704	8300,4	5614,3	10374,3	6811,7	0,28
165.8439@0.6383	18775,1	4373,4	17283,8	4420,2	0,28
Ala-Lys-Pro-Ser	6049,7	21173,5	329,3	344,1	0,28
621.4014@2.7904	1782,2	779,4	2060,6	892,3	0,28
(-)-Pyrifolidine	5804,0	3476,9	4838,6	1224,5	0,28
3-Hydroxy-2-(4-morpholinylmethyl)estra-1,3,5(10)-trien-17-one	1227,9	448,1	1088,1	355,6	0,29
142.0743@0.8457	13944,8	26200,2	6282,5	15345,8	0,29
PS(O-38:2)	1965,7	541,9	1766,4	669,4	0,29
674.6688@2.8812	2058,9	2427,1	1366,1	1209,2	0,29
215.888@0.6636	2476,2	1776,6	1973,2	827,5	0,29
Polyethylene glycol	3258,4	5676,4	1587,4	3522,3	0,29
Proline betaine	100686,5	104577,6	172889,4	322793,1	0,29
α-methyl-glutamate	4837,6	5225,4	6812,5	7003,5	0,29
565.3365@2.6809	2217,5	1301,6	1820,4	1013,7	0,29
4-Hydroxyproline	1321,1	1236,7	968,8	689,8	0,29
163.8469@0.647	60513,1	13491,9	56160,1	12864,8	0,30
Slaframine	19307,8	6833,9	17340,7	4200,0	0,30
96.0326@1.0666	42705,1	17416,3	38006,2	6415,7	0,30

5-Nonyltetrahydro-2-oxo-3-furancarboxylic acid	827,5	876,6	1139,6	1076,8	0,30
Cimifugin	25832,9	98729,6	380,7	782,9	0,30
Vitamin A	2091,8	3309,0	992,2	3562,7	0,30
605.8768@1.0053	1404,1	437,2	1271,1	366,6	0,30
615.4568@2.6911	1741,2	2041,8	1120,0	1717,8	0,31
[SP (3:0)] sphinga-4E,8E,10E-trienine	32414,9	122502,5	951,1	1511,3	0,31
2-Pyrrolidineacetic acid	5435,8	3644,8	7653,7	10087,2	0,31
184.8424@0.6136	1686,2	321,7	1585,4	298,6	0,31
B-Norcholest-4-en-3-one	5876,1	6046,3	9525,5	16756,9	0,31
80.9809@0.9861	700,5	355,3	818,1	392,6	0,31
453.929@0.997	1870,9	827,9	1629,3	631,5	0,31
[FA hydroxy(18:1)] 17-hydroxy-9Z-octadecenoic acid	348,8	451,3	192,2	564,6	0,32
PE(27:1)	1828,7	4069,4	3094,8	4011,7	0,32
Glu-Lys-Lys-Gln	1319,6	984,4	1031,8	801,9	0,32
869.1906@3.0642	66,7	161,9	24,8	66,0	0,32
Trigonelline	13500,3	30568,0	22155,6	22776,2	0,32
133.9955@0.8123	892,7	272,2	1009,1	500,2	0,32
Ricinine	5871,1	13963,6	2164,3	7630,6	0,33
199.1573@2.4151	806,5	2048,4	298,2	390,2	0,33
N-Hydroxy-L-methionine	1347,9	1940,9	2416,8	5017,3	0,33
159.8542@0.6385	3666,7	985,3	3370,0	997,3	0,34
5-Oxo-2(5H)-isoxazolepropanenitrile	64304,8	62027,1	46935,1	52159,8	0,34
Tiglylcarnitine	700,8	1182,4	1046,9	1192,7	0,35
221.0155@0.6822	900,5	352,6	807,4	258,3	0,36
Benzyl sulfate	7270,4	9376,8	9800,2	7789,4	0,36
126.8809@0.6219	2640,9	1061,1	2362,0	799,6	0,36

Norbuprenorphine	915,0	415,7	802,2	357,2	0,36
Uric acid	4785,9	4352,8	3719,1	2494,9	0,37
Arg-Leu-Leu-Phe	1408,9	1906,5	963,1	719,0	0,37
190.8668@0.6635	17146,1	5866,0	15755,7	2768,9	0,37
129.9669@1.0219	21485,9	6578,3	23329,8	6591,4	0,37
151.9486@0.9755	2598,6	831,2	2832,4	856,1	0,38
633.3242@2.6725	416,8	227,9	493,8	343,3	0,38
PI(18:2(9Z,12Z)/ 20:2(11Z,14Z))	554,6	446,3	434,9	408,9	0,38
Argenteane	1094,9	713,5	893,3	776,8	0,38
2-Methylhexanoyl-CoA	233,1	661,2	91,0	198,3	0,40
[FA amino(16:0)] hexadecanoic acid	18834,4	74778,8	3188,5	4922,0	0,40
313.2102@2.0309	2765,4	1965,6	3295,6	2131,5	0,40
Metenamine	59334,4	109514,8	36473,0	27138,8	0,41
5-Acetyl-2,4- dimethyloxazole	35018,1	8353,8	33237,0	3266,6	0,41
L-Proline	185772,6	84405,3	208206,7	93478,6	0,42
223.8384@0.6302	3168,8	1243,3	2872,3	1014,4	0,42
N-(1-Deoxy-1- fructosyl)valine	1046,9	1050,2	824,6	424,1	0,42
GlcCer(d18:2/20:0)	370,2	268,2	304,3	267,0	0,43
207.0479@0.9592	689,5	230,2	632,8	231,1	0,43
1-Linoleoylglycero- phosphocholine	34716,9	16342,2	30595,3	17790,1	0,44
1 β ,25-dihydroxy-2 β -(3- hydroxypropoxy)vitamin D3 / 1 β ,25-dihydroxy-2 β - (3- hydroxypropoxy)cholecalc iferol	1000,4	1705,6	638,2	1040,2	0,44
Robustine	914,4	2233,0	432,5	1557,9	0,44
664.3413@2.9568	2863,6	3242,9	3540,6	1944,7	0,44
206.1518@2.2096	5434,9	3466,9	6343,7	4400,2	0,45
Arg-Thr-Arg-Arg	564,0	833,9	401,1	353,0	0,45

N-Carbamoyl-N~2~-pentyglycinamide	1027,5	701,0	1582,0	3703,1	0,46
Ala-Lys-Gln-Arg	640,8	353,5	568,4	219,9	0,46
265.9417@1.0303	1845,7	636,8	1980,4	466,2	0,46
Arg-Trp-Pro-Tyr	111815,2	125686,5	137172,6	77901,0	0,46
465.3692@2.7076	1969,2	4262,6	2810,8	2373,6	0,46
3,6,9,12,15,18,21-Heptaotatetriacontan-1-ol	242,4	306,9	176,6	258,2	0,47
Cucurbitacin B	826,6	710,6	676,4	571,6	0,47
597.4828@2.9323	457,0	618,9	590,9	545,1	0,47
Fetidine	677,7	558,9	556,4	502,9	0,47
225.8349@0.6302	2956,5	1335,1	2684,2	987,7	0,47
[SP] (3'-sulfo)Galbeta-Cer(d18:0/2-OH-24:0)	118,3	120,4	200,8	582,3	0,48
Malathion monocarboxylic acid	2067,9	841,7	1906,3	544,9	0,49
162.8567@0.6052	4688,0	559,2	4832,2	837,5	0,50
868.1897@3.0636	101,6	303,5	49,0	100,8	0,50
Ile-Leu-Lys-Thr	869,4	511,1	775,7	316,6	0,50
FA oxo(14:2) cyclopentanebutanoic acid	4682,3	2667,1	5451,3	4938,9	0,51
Propafenone	2028,1	925,1	1849,7	784,9	0,51
L-Tryptophan	2189,4	1209,4	2410,0	865,2	0,52
Hexadecanedioic acid	260,8	404,7	194,7	192,6	0,54
Hydroxydestruxin B	3728,6	2191,9	3338,4	1718,5	0,54
805.2011@2.9726	125,0	346,0	70,3	141,6	0,54
LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2205,0	2186,4	2561,5	1194,2	0,54
Avadharidine	333,5	473,7	420,1	431,1	0,55
DG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:2(11Z,14Z)/0:0)	331,5	336,6	384,0	164,0	0,56
Heterodendrin	2889,5	1970,3	2550,9	1685,4	0,56
589.9029@0.9804	2095,7	963,5	1927,4	877,8	0,56

206.8476@0.6135	59168,7	8632,7	57680,9	7961,9	0,57
Benzaldehyde glyceryl acetal	1026,5	823,2	890,4	694,5	0,58
5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil	2070,6	1617,2	1829,6	864,3	0,58
Ala-Lys-Thr-Val	460,2	488,2	374,5	515,4	0,58
591.3713@2.3886	1749,7	2453,7	1399,9	1185,1	0,59
725.877@0.9886	1078,2	709,1	971,1	489,7	0,59
PC methyl(16:0)	1091,7	787,6	951,1	905,2	0,59
Gamma-Aminobutyric acid	4179,8	2091,7	3840,8	1874,8	0,59
195.1187@1.145	3331,5	2399,3	3767,2	2900,6	0,59
(E)-Urocanic acid	225510,5	164122,9	193744,7	225326,3	0,59
2-bromoporphobilinogen	1076,1	373,2	1017,2	325,7	0,60
870.1882@3.0578	72,5	224,8	42,5	76,4	0,60
Delta-Guanidinovaleic acid	2882,7	1383,2	2686,4	817,6	0,60
D-Glucose	15970,0	12991,7	14152,0	7291,3	0,60
641.2406@2.6896	810,5	587,3	721,2	509,3	0,61
657.89@0.9803	1468,4	787,1	1355,2	598,5	0,62
161.1163@0.7294	6880,6	5139,3	7579,1	3032,2	0,62
250.1781@1.9264	3707,1	5103,1	3023,2	2762,5	0,62
SM(d34:1)	12937,7	7176,4	14024,4	6868,2	0,62
[FA dimethyl,amino,tri hydrox] 1-dimethylamino-9S,11R,15S-trihydroxy-5Z,13E-prostadiene	853,9	971,1	711,5	845,8	0,62
Hypoxanthine	17024,5	11985,4	15169,0	12617,3	0,63
(S)-2,3-Epoxy squalene	529,3	1028,4	372,2	1112,5	0,64
212.8387@0.6052	2038,3	377,7	1983,6	380,2	0,64
208.1311@1.4042	27226,4	10864,2	29096,6	15835,0	0,64
903.5797@2.6004	622,9	373,7	675,9	368,1	0,65

L-Alanine	12505,7	7596,2	11585,9	4997,3	0,66
Chenodeoxycholic acid sulfate	1021,1	2146,9	1288,0	1632,7	0,66
L-Arginine	6316,6	4747,3	5699,8	4556,1	0,67
Ammonium lactate	4409,0	764,3	4323,3	439,7	0,68
1011.0305@0.8241	5576,2	2508,3	5216,1	3246,7	0,68
Compound VII	1418,5	4425,1	862,9	4259,8	0,68
Gabaculine	4366,9	2047,9	4113,8	2010,5	0,69
342.2887@2.7849	40260,4	38661,8	33167,7	77952,1	0,69
13-HDoHE	2542,9	3195,3	1964,8	6661,0	0,70
1-Pyrrolinium	3546,3	1480,4	3719,9	1637,5	0,72
12-amino-dodecanoic acid	507,5	610,0	436,6	765,9	0,74
Glycine	860,9	607,9	804,4	436,8	0,74
Tolbutamide	1678,6	1245,0	1803,6	1203,0	0,74
LysoPC(22:2(13Z,16Z))	2772,7	6978,0	3387,1	4065,0	0,74
PS(38:3)	1229,0	348,0	1189,8	490,7	0,76
N-(eicosanoyl)-1-beta-glucosyl-pentadecasphing-4-ene	390,2	349,0	360,9	251,2	0,77
Niacinamide	35343,6	13966,2	36601,4	13106,7	0,77
Asn-Ile-Ile-Val	603,6	497,1	645,5	428,6	0,78
Pyrimidine 5'-nucleotide	4848,2	3954,9	5147,5	2594,3	0,78
220.8544@0.6492	3091,3	1791,2	3212,8	786,9	0,79
715.6098@3.1629	1352,5	1469,7	1443,9	416,5	0,81
N-(2-hydroxyhexacosanoyl)-4,8-sphingadienine	131,6	110,4	141,5	162,2	0,81
253.1889@1.9752	5249,0	4061,9	4920,9	4954,3	0,81
261.8238@0.6302	1841,5	332,6	1864,5	339,9	0,83
178.8526@0.6053	2686,2	521,7	2721,5	519,6	0,83
(2R*,3R*)-1,2,3-Butanetriol	18493,7	29811,6	20100,9	9988,4	0,83
166.8492@0.5968	1689,7	412,7	1667,5	320,3	0,85

L-Isoleucine	8811,8	18349,2	9787,9	16090,6	0,86
Ala-Leu-Phe-Arg	424,4	392,3	400,3	513,5	0,86
3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/22:0)	884,5	958,6	785,2	2736,5	0,86
Triricinolein	1257,3	1092,0	1310,1	806,9	0,86
3-Buten-1-amine	5337,3	2219,6	5452,3	2340,2	0,87
Carboxynorspermidine	2515,1	1887,3	2607,9	2448,1	0,89
243.0597@0.7052	8257,5	6317,2	8504,4	4322,6	0,89
2,5-Dioxopiperazine	1235,6	722,8	1207,5	681,1	0,90
Scutianine F	1865,1	1652,2	1921,9	973,0	0,90
Destruxin B	1260,4	460,6	1278,8	663,9	0,91
LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	10967,8	4637,5	11150,2	7334,1	0,92
PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	682,8	348,4	695,2	499,2	0,92
Citrulline	2377,5	2157,3	2300,3	3463,8	0,93
204.8519@0.6052	3693,9	818,7	3671,9	743,6	0,93
2alpha-Methyl-17beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-5alpha-androstan-3-one	461,0	647,9	486,4	1229,9	0,93
L-Lactic acid	225510,2	126475,8	229443,3	192554,1	0,94
Lys-Val-Gln	397,0	591,9	382,7	579,7	0,94
Glycerol triundecanoate	480,9	286,7	488,4	382,7	0,94
Hydroxypropyl-Methionine	9613,0	10384,4	9806,7	6147,3	0,95
Leu-Lys-Thr-Thr	534,2	447,3	523,5	615,0	0,95
p-Fluorophenylalanine	11944,3	7799,9	12093,7	9114,2	0,95
Arg-Cys-Arg-Arg	663,9	344,7	656,9	534,0	0,96
N,N-dimethylacetamide	5396,5	3496,7	5451,2	3165,4	0,96
GYKI 52466	9136,2	5258,9	9212,6	4730,8	0,96
531.3776@2.7142	2057,3	5453,1	2124,7	2455,3	0,96
Ebastine	301,2	194,5	304,0	216,9	0,97

Campest-4-en-3-one	1542,1	3422,8	1488,0	4719,4	0,97
197.9545@1.0216	1409,8	435,1	1408,9	428,7	0,99
1-Pyrrolidinecarbox- aldehyde	32881,9	20674,1	32913,0	9286,3	1,00

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Helene Mayer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse von Metaboliten in Trockenblut für die nicht-invasive Diagnose der akuten Organabstoßung nach Lebertransplantation“ (englisch: „Analysis of metabolites in dried blood samples for non-invasive diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation“) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Erstbetreuer Herrn PD Dr. med. Felix Krenzien und meinem Zweitbetreuer Herrn PD Dr. med. Moritz Schmelzle für die Begleitung während der Erstellung der Doktorarbeit und die Überlassung des interessanten Themas.

Danken möchte ich außerdem dem gesamten Team der AG Krenzien, insbesondere Dr. rer. medic. Dipl. Ing. Annekatriin Leder und Dr. rer. nat. Katrin Splinth.

Für die Auswertung der Trockenblutproben und die fachlichen Hinweise sei Frau Dr. Olivia Gräbner und ihrem Team von Metabolomic Discoveries gedankt.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie danke ich für die finanzielle Förderung dieser Studie.

Ganz besonders danke ich natürlich meiner Familie, die mir das Studium ermöglichten und mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit stets und unermüdlich unterstützten.

Zuletzt möchte ich meinem Freund, Sören, danken, der immer an meiner Seite stand und steht.