

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Grundlagen

### 1.1.1. Albumin

Die nicht-korpuskulären Komponenten des Blutes können in hochmolekulare Bestandteile wie Proteine und Lipoproteine, sowie in niedermolekulare Bestandteile, zu denen die Elektrolyte, Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Cholesterin, Blutglukose u.a. zählen, eingeteilt werden.

Albumine gehören wie die Globuline zur Gruppe der globulären Proteine.

Diese Proteine, auch Sphäroproteine genannt, besitzen eine mehr oder weniger ausgebildete kugelförmige Tertiärstruktur, bei der die unpolaren Seitenketten in das Molekülinnere, die polaren hingegen nach außen ragen und somit zur Wasserlöslichkeit des Moleküls beitragen. Man differenziert Untergruppen, die sich über das Löslichkeitsverhalten, das auf das Verhältnis von unpolaren zu polaren Strukturelementen im Molekül zurückgeht, definieren.

Das Albumin, mit einem Molekulargewicht um ca. 66000 Dalton, stellt eine Polypeptidkette aus 584 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren dar. Es macht als Serumalbumin ungefähr 52-62% des Gesamteiweißes im Blutplasma aus, und seine Konzentration ist eine Folge von Synthese, Verteilung, Abbau und Verlust an Albumin.

Daneben finden sich vier weitere Fraktionen an Plasmaproteinen ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline), die mit Hilfe der Trägerelektrophorese aufgetrennt werden können.

Für die Synthese der Plasmaproteine, mit Ausnahme der Immunglobuline, ist die Leber verantwortlich. Insgesamt beträgt die Syntheserate von Albumin 0,2 g/kg KG/d (Mitzner, S.R. 1999) und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Weigand, K. 1980; Rothschild, M.A. et al. 1988):

- Von der Versorgung mit Aminosäuren,
- vom onkotischen Druck,
- von Kortikosteroiden und anabolen Steroiden, die die Produktion von Albumin erhöhen,
- von Thyroxin, das einerseits die Synthese ebenfalls erhöht, andererseits den Austritt von Albumin aus der Blutbahn fördert und damit den Albuminabbau induziert,

- von Proteinen der akuten Phase und der Gammafraktion, deren vermehrte Synthese mit einer verminderten Albuminsynthese einhergeht und
- von diversen Lebererkrankungen, die den Spiegel der von der Leber produzierten Plasmaproteine sinken lassen.

Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen Synthese und Abbau von Albumin ein Gleichgewicht, das zu einer täglichen Metabolisierung von 10% des Plasmaalbumingehaltes führt (Rossing, N. 1978; Weigand, K. 1980). Erniedrigte Albuminspiegel sind außerdem auf eine Hyperhydratation, Sekretionsstörungen in den Intravasalraum, Verteilungsstörungen zwischen dem Intra- und Extravasalraum sowie auf eine kongenitale Analbumie zurückzuführen (Weigand, K. 1980).

Der Abbau von Albumin erfolgt neben Verlusten über den Magen-Darm-Trakt und die Niere hauptsächlich durch intrazelluläre Prozessierung in der Leber bei einer Halbwertszeit von ca. 20 Tagen.

Die Funktion von Albumin liegt hauptsächlich in der Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens und der Regulierung des kolloidosmotischen (onkotischen) Druckes (Weigand, K. 1980). Dabei ist Albumin als Molekül zu groß, um die Gefäßwand zu passieren (semipermeable Membran) und verhindert durch seine Fähigkeit der Wasserbindung eine Diffusion von Flüssigkeit aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe. Ein Gramm (1 g) Albumin ist in der Lage, 18 ml Wasser an sich zu binden und ist trotz seines relativ niedrigen Molekulargewichts zu ca. 80% dafür verantwortlich, den kolloidosmotischen Druck aufrecht zu erhalten (Mitzner, S.R. 1999).

Der isoelektrische Punkt des Humanalbumins liegt zwischen einem pH-Wert von 4,4 und 5,4. Im Bereich des physiologischen pH-Wertes des Blutes ist Albumin daher stark negativ geladen und zeigt im elektrischen Feld der Eiweißelektrophorese von allen Plasmaproteinen die höchste Geschwindigkeit. Durch diese stark negative Ladung fungiert Albumin zusätzlich als Trägerprotein für wasserunlösliche Stoffe (Mitzner, S.R. 1999). Es ist in der Lage, Anionen, Spurenelemente und Stoffwechselprodukte wie Bilirubin, freie Fettsäuren, Hormone oder auch Medikamente an sich zu binden und durch den Körper zu transportieren.

Auch zur Pufferkapazität des Blutes liefert Albumin einen enormen Beitrag, wobei diese durch die ionisierbaren Seitengruppen bestimmt ist, unter denen der Imidazolring des Histidin besonders wirksam ist. Schließlich stellt Albumin eine Form der Eiweißreserve dar, es kann unter bestimmten Bedingungen abgebaut werden und als Baustein für andere Proteine dienen (Schmidt, R.F. et al. 1997).

Die Verteilung von Albumin im Organismus entspricht einem Zweikompartimentenmodell, wobei ca. 40% auf den intravasalen Flüssigkeitsraum und ca. 60% auf den extravasalen Flüssigkeitsraum entfallen (Matthews, C.M. 1957; Rossing, N. 1978; Weigand, K. 1980).

Beim Betrachten des Extravasalraumes findet sich eine weitere Gliederung in zwei Subkompartimente, wobei das erste die viszerale Organe und das zweite Subkompartiment die Skelettmuskulatur und die Haut umfasst. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung des Albumins zwischen Plasma und interstitiellem Raum von der Art der Subkompartimente ab. Wegen der erhöhten Kapillarpermeabilität für Albumin in den viszerale Organen zeigt sich ein relativ erhöhter Austausch zwischen Eiweiß aus Intra- und Extravasalraum ( $t_{1/2}$  ca. 3 Stunden). Hingegen zeigt das Subkompartiment für Haut und Skelettmuskulatur eine deutlich geringere Kapillarpermeabilität für Albumin und somit auch eine verminderte Austauschgeschwindigkeit ( $t_{1/2}$  ca. 24 Stunden) (Rossing, N. 1978).

Zwischen intra- und extravasalem Flüssigkeitsraum findet ein Gesamtaustausch von ca. 5% der intravasalen Albuminmenge pro Stunde statt (transcapillary escape rate). Diese transkapilläre Austauschrate von Albumin kann unter diversen Bedingungen erhöht sein, dazu zählen Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Verbrennungen, Leberzirrhose, diabetische Mikroangiopathie u.a. (Parving, H.H. et al. 1977; Parving, H.H. et al. 1973; Weigand, K. 1980), aber auch Stresssituationen, die gleichfalls die transkapilläre Sekretion von Albumin steigern. Extravaskuläres Albumin wird dann über das Lymphsystem wieder zurück in die Blutbahn transportiert, und es wird damit ein kompletter Austausch des intravasalen Gesamtalbumins erzielt.

Außerhalb dieses Spektrums findet sich Albumin zudem noch im Liquor und kommt dort in einer Konzentration bis maximal 35 mg/dl vor. Bei gestörter Blut-Hirn-Schranke tritt es vermehrt aus der Blutbahn in den Liquor über und lässt sich unter Verwendung des Liquor/Serum-Quotienten quantifizieren. Erhöhte Quotienten zeigen eine Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke an. Sie dienen demnach als empfindliche Parameter für Schrankenstörungen, wie sie bei Entzündungen, Traumata, Tumoren etc. vorkommen können (Reiber, H. 1994).

## **1.1.2. Mikroalbuminurie**

### **1.1.2.1. Epidemiologie**

In der MONICA-Studie von Liese, A.D. et al. (2001) wird die Assoziation zwischen einer Mikroalbuminurie und dem Vorliegen eines metabolischen Syndroms bei nicht-diabetischen Männern und Frauen untersucht. Die Prävalenz einer Mikroalbuminurie in dieser Studie zeigt Ergebnisse von 7,5% bei Frauen und 8% bei Männern. Ferner treten höhere Prävalenzwerte bei dem Vorliegen einer Adipositas oder eines Hypertonus auf.

Patienten mit einem primären Hypertonus ohne diabetische Begleiterkrankung werden in einer Studie von Pontremoli, R. et al. (2002) hinsichtlich dieser Fragestellung genauer verfolgt, und es ergeben sich Prävalenzen für einen positiven Mikroalbuminurietest von 8-15%.

Besonders stark ist die Assoziation zwischen einer Mikroalbuminurie und einem Diabetes mellitus. Liegt ein Diabetes mellitus als alleinige Erkrankung vor, steigen die Prävalenzwerte für eine Mikroalbuminurie 10 Jahre nach Erstmanifestation auf 24,9%, für eine Makroalbuminurie auf 5,3% und für die Erhöhung der Retentionsparameter auf 0,8% (Adler, A.I. et al. 2003).

Bei Personen ohne Nebendiagnosen wie Diabetes mellitus, Hypertonus, kardiovaskuläre Erkrankungen oder erhöhte Retentionsparameter liegt die Prävalenz bei 5,1% (Jones, C.A. et al. 2002).

### **1.1.2.2. Allgemeines**

In den Glomeruli der Niere entsteht ein Ultrafiltrat, das durch den kapillären Blutdruck von 48 mmHg aus den glomerulären Kapillarschlingen in die Bowman-Kapselräume abgepresst wird. Diesem Druck wirken allerdings der Druck der Bowman-Kapsel von ca. 13 mmHg und auch der kolloidosmotische Druck in den Gefäßen von ca. 25 mmHg entgegen, sodass letztlich der effektive Filtrationsdruck von etwa 10 mmHg die treibende Kraft für die Filtration über die gesamte Länge der Kapillaren darstellt (Klinke, R. et al. 1996). Die Filtration geschieht entlang einer Membran, die von innen nach außen aus drei Schichten aufgebaut ist: Der Schicht der Endothelzellen, gefolgt von der Basalmembran und schließlich der Schicht der epithelialen Podozyten. Diese stellen eine Filtrationsbarriere dar und bedeuten für Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung ein Passagehindernis. Wasser und niedermolekulare Substanzen werden im Gegensatz zu höhermolekularen Stoffen, zu denen vor allem Plasmaproteine zählen, beim Durchgang nicht behindert. Der Grenzwert für eine freie Filtration liegt bei einem Molekulargewicht (MG)

von 6-15 kDa. Für Moleküle mit einem MG über 80 kDa ist der Filter nahezu dicht. Stoffe, deren Molekülradius zwischen den genannten Grenzen liegt – dazu zählt zu einem geringen Anteil auch das Albumin – werden nur teilweise filtrierte.

Dabei wird in Experimenten mit Ratten festgestellt, dass hochmolekulare Stoffe, die genauso groß sind wie das negativ geladene Albumin, stärker filtrierte werden, wenn sie ungeladen sind oder noch leichter passieren können, wenn sie positiv geladen sind (Bohrer, M.P. et al. 1978). Dieser Zustand beruht auf den negativen Wandladungen des Filters, die sich sowohl in der Außenschicht der Basalmembran als auch in der Schicht der epithelialen Podozyten finden lassen und zu einem großen Teil durch Heparansulfat verursacht sind (Kanwar, Y.S. et al. 1984; Stow, J.L. et al. 1985).

Einen der wichtigsten Gründe für die Förderung einer vermehrten Filtration von Albumin stellt die Einstellung des Blutdruckes dar (Gall, M.A. et al. 1991; Jensen, J.S. et al. 2000). Früher war man der Ansicht, eine Persistenz des erhöhten Blutdruckes sei notwendig, um eine ausreichende Filtration in den bereits geschädigten Glomeruli der Nieren und die Funktion anderer Organe zu sichern (Erfordernis-Hochdruck) (Volhard, F. 1923). Heute geht man davon aus, dass sich das Absenken des hohen Blutdruckes protektiv auf die Nieren und die kardiovaskulären Organe auswirkt (Brazy, P.C. et al. 1989; Mogensen, C.E. 1982).

Zum Beispiel sind bei Diabetikern durch eine afferente Vasodilatation die präglomerulären Gefäße dilatierte. Es ist somit selbst bei einem normotonen Patienten der glomeruläre Gefäßdruck im Vergleich zum Nicht-Diabetiker erhöht. Besteht nun gleichzeitig eine Hypertonie, so ist das Ausmaß der glomerulären Schäden groß. Das Beispiel der Nieren zeigt, dass sich durch den Verlust der Autoregulation selbst eine geringfügige Blutdruckerhöhung direkt an dem glomerulären Kapillarbett auswirkt und die Glomeruli weiter schädigen kann (Mogensen, C.E. 2005).

Außerdem wird deutlich, dass Patienten mit Diabetes mellitus neben dem Risiko einer Nephropathie auch eine erhöhte Anfälligkeit besitzen, eine Retinopathie und andere kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln (Borch-Johnsen, K. et al. 1987; Hansson, L. et al. 1998).

Laut Schrier, R.W. et al. (2002) zeigt sich, dass eine Senkung des Blutdruckes in den Bereich normotensiver Werte sowohl den Prozess einer Retinopathie verlangsamt als auch das Entstehen von Schlaganfällen drastisch mindert.

Die Höhe des Blutdruckes ist aber nicht der einzig beeinflussende Faktor für eine vermehrte Ausscheidung von Albumin im Urin. Eine weitere Rolle spielt die Konzentration des Blutzuckers (Weir, M.R. 2004). Dabei kann eine prospektive Studie zeigen, dass eine optimale Blutzuckereinstellung die mikrovaskulären Schäden vermindert und die Mikroalbuminurie der Pati-

enten um ca. 30% verringert (UKPDSG 1998).

Bei langfristig erhöhten Blutglukosewerten sind laut van der Woude, F.J. et al. (1997) sowohl die Proteoglykane als auch die Glykosaminoglykane für den Zustand der Mikroalbuminurie verantwortlich. Patienten mit einer diabetischen Nephropathie zeigen ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der Menge der Seitenketten von Heparansulfat und dem Vorkommen einer Albuminurie (Rohrbach, R. 1986). Eine Hyperglykämie führt zu einer verminderten Sulfatisierung von glomerulärem Heparansulfat durch eine wahrscheinlich fehlerhafte Funktion der N-Deacetylase (Kjellen, L. et al. 1983), und es kommt dadurch zu einem Verlust der negativen Ladungen an der glomerulären Basalmembran und ferner zu einer Veränderung ihrer membranösen Mikrostruktur (Hunsicker, L.G. et al. 1981). Da diese negativen Ladungen - wie oben erwähnt - letztlich verantwortlich dafür sind, dass das negativ geladene Albumin nicht filtriert wird, kommt es bei einem Verlust des Heparansulfats zu einer verstärkten Mikroalbuminurie.

Weitere Ursachen einer Filtration für Albumin sind genetische Variationen wie beispielsweise der Polymorphismus des Angiotensin-Converting Enzymgens, der mit einem vermehrten Risiko für vaskuläre Läsionen sowohl in nicht-diabetischen als auch in diabetischen (NIDDM) Patienten assoziiert ist (Jeffers, B.W. et al. 1997), oder Defekte in der tubulären Resorption, bei denen eher kleine Proteine wie  $\alpha_1$ -Mikroglobulin oder  $\beta_2$ -Mikroglobulin im Urin erscheinen (Weber, M.H. et al. 1985).

Geschlechtsspezifisch betrachtet lässt sich bei Männern eine gesteigert positive Assoziation hinsichtlich der Mortalität und einer großen Anzahl von Urinproben mit einem Albumin-Kreatinin-Quotienten oberhalb des Normwertes eruieren (Romundstad, S. et al. 2003). Die Relevanz des Alters für das Auftreten einer Mikroalbuminurie hat Damsgaard, E.M. et al. (1990) in einer Studie mit Patienten zwischen dem 60. und 74. Lebensjahr untersucht. Es fällt auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Albuminausscheidungsrate und der Mortalität (besonders an kardiovaskulären Ereignissen) im Alter besteht.

Auch Rauchen - gemessen an der Expositionsdauer und nicht an der konsumierenden Menge - ist nach Briganti, E.M. et al. (2002) und Chase, H.P. et al. (1991) relevant für das Ergebnis einer Nierenschädigung mit einem erhöhten Albumin-Kreatinin-Quotienten bzw. einer verminderten glomerulären Filtrationsrate. Es stellt sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II eine größere Gefahr der Entwicklung einer Nephropathie dar und beschleunigt das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz auch bei anderen inflammatorischen oder nicht-inflammatorischen Nierenerkrankungen nach Orth, S.R. et al. (1997) um nahezu das Doppelte.

Zusätzlich liegt der vermehrten Ausscheidung von Albumin im Urin eine Schädigung im gesamten Endothelsystem und folglich auch in Höhe der Glomeruli zugrunde (Pontremoli, R. 1996; Deckert, T. et al. 1989).

Diese Annahme wird durch die Feststellung erhöhter Konzentration von von-Willebrand-Faktor-Antigenen gestützt, die dann vorliegt, wenn ein Endothelschaden nachweisbar ist. In Studien von Pedrinelli, R. et al. (1994) kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Ausscheidungsrate von Albumin und dem Vorhandensein des von-Willebrand-Faktors festgestellt werden.

Auch die Proteine im Filtrat der Niere selbst besitzen eine nephrotoxische Wirkung auf das tubuläre System und bedingen ein Fortschreiten der Nierenschädigung (Bramlage, P. et al. 2003).

Schließlich wird für die verstärkte Filtration von Albumin eine erhöhte Konzentration von Angiotensin-II verantwortlich gemacht, die zum einen die Durchlässigkeit der glomerulären Permeabilitätsbarrieren beeinflusst, zum anderen Auswirkungen auf die Höhe des systemischen Blutdruckes hat. Ein erhöhter systemischer Blutdruck fördert in Folge eine Konstriktion der efferenten Kapillaren und steigert den Druck auf die Glomeruli der Niere. Beide Vorgänge haben einen negativen Einfluss auf den Verlauf einer Mikroalbuminurie (Bramlage, P. et al. 2003).

**Tabelle 1:** Risikofaktoren einer Albuminurie (de Jong, P.E. et al. 2004)

<b>unbeeinflussbar</b>	<b>beeinflussbar</b>	
	<b>sicher</b>	<b>unsicher</b>
Rasse	Diabetes	Hyperlipidämie
Geschlecht	Hypertonus	Salz/Proteine
Alter	Adipositas	orale Kontrazeptiva
Niedriges Geburtsgewicht	Rauchen	Hormonersatztherapie

Entsprechend der elektrophoretischen Auftrennung lässt sich eine Proteinurie in verschiedene Muster einteilen (Herold, G. 2003). Dazu zählt die hochmolekulare glomeruläre Proteinurie, die man bezüglich qualitativer Unterschiede der Glomerulusläsionen weiter in eine selektiv glomeruläre Proteinurie und in eine nichtselektiv glomeruläre Proteinurie gliedert. Erstere findet sich bei leichten glomerulären Schäden (z.B. minimal-change-nephritis) und verursacht eine Ausscheidung von ca. 100-3000 mg Albumin/g Kreatinin im Urin, wohingegen sich eine nichtselektiv glomeruläre Proteinurie durch eine erhöhte Ausscheidung von höhermolekularen Proteinen auszeichnet.

Kleinmolekulare Proteinurien erkennt man an einer erhöhten Konzentration von  $\alpha_1$ -Mikroglobulin im Urin, die durch eine fehlende tubuläre Rückresorption bei chronisch tubulären Läsionen bedingt ist.  $\alpha_1$ -Mikroglobulin, ein Glykoprotein, das vorwiegend in den proximalen Tubuluszellen vorkommt, scheint sowohl als Indikator für tubuläre als auch für gemischte Proteinurien (glomerulär-tubuläre Mischproteinurien) geeignet (Weber, M.H. et al. 1985).

Schließlich unterscheidet man eine prärenale von einer postrenalen Proteinurie (Herold, G. 2003). Bei der prärenalen oder auch „Überlauf“-Proteinurie wird die Kapazität der tubulären Rückresorption durch ein vermehrtes Anfallen dieser Proteine überschritten wie sie bei der Bence-Jones-Proteinurie wegen einer ursächlichen monoklonalen Gammopathie, sowie bei Myoglobinurien oder Hämoglobinurien auftreten. Postrenale Proteinurien zeichnen sich durch tubulär sezernierte Proteine (z.B. Tamm-Horsfall-Protein) aus und sind ein Korrelat für die Funktion des distalen Tubulus (Zimmerhackl, L.B. 1993).

Eine vorübergehende Erhöhung der Albuminkonzentration findet sich auch bei Gesunden und unterliegt einer starken biologischen Variabilität (Pedrinelli, R. et al. 2002; Mogensen, C.E. et al. 1995). Nennenswert sind besonders die tagesabhängigen Schwankungen, wobei am Tag eine um 25% stärkere Ausscheidungsrate gemessen werden kann als in der Nacht. Auch die Schwankungen von einer 24-h-Periode zur nächsten beschreiben Variationen von bis zu 40-50%.

Menschen, die sich einer körperlichen Anstrengung, Orthostase, emotionalem Stress oder einem Temperaturstress (Hitze/Kälte) aussetzen, weisen interindividuelle Schwankungen der Albuminkonzentration auf. Und auch Erkrankungen wie eine Herzinsuffizienz, Blutzuckerentgleisungen oder selbst operative Eingriffe können zu einer reversiblen Albuminurie führen. Ein Fünftel aller Frauen zeigt während der Schwangerschaft Werte einer benignen Albuminurie, bei denen es sich um passagere Ergebnisse handelt und die Konzentrationen von 300 mg/l nicht überschreiten. In besonderem Maße kann dies bei einem Vena-cava-Kompressionssyndrom auftreten (Scherberich, J. 1998). Weitere Ursachen einer flüchtigen Mikroalbuminurie können entzündliche Erkrankungen, wie Harnwegsinfekte oder akut fieberhafte Erkrankungen sein (Mogensen, C.E. et al. 1995). Zur weiteren Einschätzung des Krankheitsgrades ist es hier notwendig, eine Wiederholung des Tests zu machen, die durch mindestens zwei im Abstand von zwei bis vier Wochen gemessene Bestätigungsuntersuchungen zu erfolgen hat. Erst dann wird der hohen spontanen Variabilität der Albuminausscheidung Berücksichtigung geschenkt.



Einheitliche Werte, die eine Mikroalbuminurie definieren, beginnen bei einer Ausscheidung von 20 mg/l oder 30 mg/24h und gehen bei Erreichen des Grenzwertes von 200 mg/l oder 300 mg/24h in die so genannte Makroalbuminurie oder Proteinurie über.

**Tabelle 2:** Referenzwerte einer Proteinurie (Molitch, M.E. et al. 2004; Mogensen, C.E. et al. 1995; Bilous, R. 1995; Zelmanovitz, T. et al. 1997; Pontremoli, R. 1996; Pontremoli, R. et al. 2002; Herold, G. 2003)

	<b>24h SU</b> <sup>1</sup> (mg/24h)	<b>Min-SU</b> <sup>1</sup> (µg/min)	<b>SpU ACR</b> <sup>2</sup> (mg Alb/g Cr)	<b>SpU Alb- Konz.</b> <sup>3</sup> (mg/l)
<b>Normal</b>	<30	<20	<30	<20
<b>Mikroalbuminurie</b>	30-299	20-199	30-299	20-199
<b>Klin. Albuminurie</b>	≥300	≥200	≥300	≥200

<sup>1</sup> Sammelurin

<sup>2</sup> Spontanurin Albumin-Kreatinin-Ratio

<sup>3</sup> Spontanurin Albuminkonzentration

Der Beginn einer Schädigung im Endothelsystem und der folgende Anstieg des kardiovaskulären Risikos liegt aber schon vor der Schwelle der definierten Mikroalbuminurie (Gerstein, H.C. et al. 2001; Selby, J.V. et al. 1990). Klausen, K. et al. (2004) propagiert für eine Schwelle der symptomatischen Mikroalbuminurie bei einem Wert von >4,8 µg/min. Jedoch kann in der Regel eine vermehrte Durchlässigkeit und folgende Ausscheidung von Albumin im Urin frühestens im Stadium der Mikroalbuminurie nachgewiesen werden. Es sind also präzisere Testmöglichkeiten für den Nachweis geringer Mengen von Albumin im Urin interessant, die ein frühzeitiges Diagnostizieren und Therapieren dieser Schäden ermöglichen.

### 1.1.2.3. Therapie

Die Nierenfunktion - also die glomeruläre Filtrationsrate - ist im Stadium der Mikroalbuminurie noch nicht eingeschränkt. Der Nachweis einer vermehrten Ausscheidung von Albumin ist dementsprechend ein zur Verfügung stehendes Frühwarnsystem für eine Nephropathie. Eine sich anschließende klinische Manifestation ist gekennzeichnet durch eine irreversible Proteinurie, gefolgt von einer Erhöhung der Serumretentionswerte.

In diesem frühen Zeitraum sind noch therapeutische Interventionen möglich, um die pathologisch erhöhten Werte für Albumin im Urin zu korrigieren und somit eine Verschlechterung der Nierenfunktion zu verhindern.

Das Grundziel diabetischer Patienten liegt in der Prävention einer diabetischen Nephropathie. Hierunter zählen Maßnahmen wie die normnahe Einstellung der Blutglukose und nach der Modification-of-Diet-in-Renal-Disease-Studie die Senkung des Blutdruckes auf Werte von <130/80 mmHg, die einem Wert unterhalb der oberen Normgrenze entsprechen. Bei einer Proteinurie von >1 g/d wird eine Senkung des Blutdruckes unter 125/75 mmHg empfohlen (Peterson, J.C. et al. 1995).

Liegt eine diabetische Nephropathie bereits vor, so ist das vorrangige Ziel, eine Progression dieser Erkrankung zu verhindern. Wichtig ist auch hier eine angepasste Lebensführung mit rigoroser Blutzuckereinstellung, konsequent geführter antihypertensiver Therapie (s.u.), der Verzicht auf Nikotin (Schiffl, H. et al. 2002), die Reduzierung von Lipiden (Bianchi, S. et al. 2003) und die diätetische Restriktion der Eiweißzufuhr (Pedrini, M.T. et al. 1996).

Der Nutzen einer antihypertensiven Therapie für den Verlauf einer Nierenerkrankung ist in Studien sowohl für die diabetische als auch für die nicht-diabetische Nephropathie nachgewiesen (Alvestrand, A. et al. 1988). Erreicht werden können diese Zielwerte durch eine nicht-medikamentöse Therapie (z.B. Gewichtsreduktion, Kochsalzreduktion, Ausdauertraining etc.) und später auch durch eine medikamentöse Therapie, die sich aus dem Stufenschema der Hochdruckliga ableitet.

Den ACE-Hemmern und den Angiotensin-II Rezeptorantagonisten wird hierbei eine besondere Stellung eingeräumt:

Bei vielen chronischen Nierenerkrankungen - einschließlich der diabetischen Nephropathie - ist das Renin-Angiotensin-System (RAS) aktiviert und bedingt über verschiedene Mechanismen des Angiotensin II eine Mikroalbuminurie (s.o.). So führt auch Glukose zu einer direkten Aktivierung des RAS, und es ist folglich pathophysiologisch sinnvoll, eine Hemmung dieses Systems zu erzielen, um einer Mikroalbuminurie entgegenzuwirken. Dies geschieht beim Diabetes mellitus Typ I und bei anderen chronischen Nierenerkrankungen mithilfe einer Behandlung mit ACE-Hemmern, die eine protektive Wirkung auf die Nieren haben und das Fortschreiten einer Nierenerkrankung laut Wenzel, U.O.(2001) verzögern. Die Therapie der Mikroalbuminurie beim Diabetes mellitus Typ II ist in wenigeren Studien belegt, aber auch hier ergab sich ein eindeutiger Nutzen der Verabreichung von ACE-Hemmern (Ahmad, J. et al. 1997; Ravid, M. et al. 1998; Cordonnier, D.J. et al. 1999). Kontrovers bleibt die Frage, ob ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-

Antagonisten als Mittel der ersten Wahl verabreicht werden sollten. Hierzu ergeben Untersuchungen eine renoprotektive Äquivalenz zwischen ACE-Hemmern und AT1-Rezeptor-Antagonisten bei der Therapie hypertoner Patienten mit einer diabetischen Nephropathie (Diabetes mellitus Typ II) in placebokontrollierten Studien (Brenner, B.M. et al. 2001; Lewis, E.J. et al. 2001). Direkte Vergleiche beider Medikamente stehen derzeit noch aus. Auch liegen noch keine Ergebnisse für Studien über die AT1-Rezeptor-Antagonisten bei nicht-diabetischer Nephropathie und diabetischer Nephropathie (Diabetes mellitus Typ I) vor.

## **1.2. Methoden zur Bestimmung einer Mikroalbuminurie**

Heute unterscheidet man verschiedene hochspezifische Labormethoden zur Messung der Albuminkonzentration im Urin, darunter zählt man zum Beispiel den RIA (Radio-Immuno-Assay), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), die radiale Immundiffusion nach Mancini, die Nephelometrie oder auch die Turbidimetrie. Als Alternative zu diesen eher aufwendigen Methoden dienen immunologische Schnellteststreifen wie zum Beispiel der Micral-Test II<sup>®</sup> oder der Rapitex-Albumin<sup>®</sup>-Teststreifen. Sie sind ebenfalls für Screening-Untersuchungen geeignet, wenn kein Labor zur Verfügung steht, da ihre diagnostischen Fähigkeiten an die der Labormethoden heranreichen.

Mit diesen Tests ist zum Teil eine semiquantitative Bestimmung der Albuminkonzentration bzw. eine Selbsttestung durch den Patienten möglich. Schnelltests auf nichtimmunologischer Basis sind beispielsweise durch den Microbumin-Test<sup>®</sup> vertreten.

Diese genannten Formen der Albumintestung erlauben die Diagnostik einer Mikroalbuminurie. Andere Protein-Teststreifen wie der Combur-Test<sup>®</sup>, der Albustix<sup>®</sup> u.a. können zum Nachweis einer Mikroalbuminurie nicht verwendet werden, dienen aber beim Vortesten des Urins zum Ausschluss einer Makroalbuminurie. Im Folgenden soll genauer auf die Funktionsprinzipien der einzelnen Testformen eingegangen werden.

### **1.2.1. Nephelometrie**

Unter Nephelometrie versteht man die Bestimmung der Intensität des seitlich abgelenkten Lichtes nach Passage eines streuenden Mediums (Dornblüth, O. et al. 1990). Die Ablenkung dieser Lichtstrahlen in einer kolloidalen Lösung erfolgt in alle Richtungen und entspricht dem Prinzip

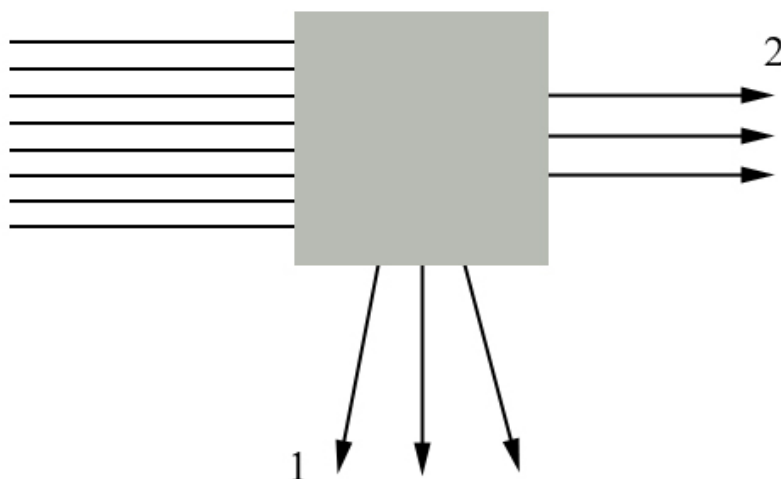
von Faraday-Tyndall. Das Streulicht wird aufgefangen und über ein Linsensystem auf einen Photodetektor fokussiert. Dabei entspricht das Messsignal des Detektors der Intensität des Streulichtes. Abhängig ist die Streuintensität von der Anzahl und Größe der streuenden Partikel.

Für nephelometrische Messungen sind spezielle Photometer notwendig, die eine starke Lichtquelle, eine seitliche Messung und einen sensiblen Photodetektor gewährleisten. Sie ermöglichen eine empfindliche Bestimmung der Konzentration einer zu untersuchenden kolloidalen Lösung.

### 1.2.2. Turbidimetrie

Bei der Turbidimetrie (Trübungsmessung) handelt es sich um ein Verfahren, das in trüben Dispersionen die Konzentration eines bestimmten Feststoffes bestimmen kann (Dornblüth, O. et al. 1990). Dabei misst es die Intensitätsabnahme eines einfallenden Lichtstrahls nach dem Durchgang durch das streuende Medium. Gemessen wird die Extinktion bzw. Absorption mit Hilfe eines einfachen Photometers und die Trübungsänderung der Probe kann dann gegenüber einem als Referenzwert dienenden Leerwert bestimmt werden. Dieses Prinzip wird in dem Modular P800, Roche/Hitachi verwendet, das die Gegenmessung der Albuminwerte im Urin als Goldstandard in dieser Arbeit übernimmt.

#### Skizze 1: Prinzip von Turbidimetrie und Nephelometrie



<sup>1</sup> nephelometrische Messung (Streulichtmessung)

<sup>2</sup> turbidimetrische Messung (Trübungsmessung)

### **1.2.3. Radiale Immundiffusion nach Mancini**

Auch die radiale Immundiffusion stellt eine Methode zur Bestimmung von Albumin dar. Hierbei handelt es sich um eine Immunreaktion, bei der in Argarose enthaltene Antikörper mit Antigenen (als Beispiel Albumin) präzipitieren (Dornblüth, O. et al. 1990). Diese Antigene werden in vorgestanzte Pipettierlöcher gebracht und beginnen im Folgenden eine nach außen gerichtete Diffusion.

Der dadurch entstehende Durchmesser des Präzipitattringes ist zur Konzentration des hinzugefügten Antigens proportional. Über die Verwendung von Eichkurven mit Standardseren ist eine Berechnung und Interpretation der entstandenen Präzipitatringe möglich.

### **1.2.4. RIA (Radio-Immuno-Assay)**

Unter dem Radio-Immuno-Assay versteht man eine durch Berson, S.A. et al. (1956) entwickelte Labormethode zur Quantifizierung kleinster Mengen eines Substrates. Zur Durchführung werden spezifische Antikörper verwendet, die sich gegen das zu diagnostizierende Antigen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden. Bei diesem radioimmunologischen Verfahren handelt es sich um eine kompetitive Reaktion, da der Probe weitere Antigene mit radioaktiver Markierung hinzugefügt werden. Diese konkurrieren mit den restlichen Antigenen um die freien Bindungsstellen der Antikörper. Nach einer gewissen Inkubationszeit kann die Strahlungsintensität bestimmt werden, die sich indirekt proportional zu der Substratkonzentration verhält. Das Prozedere der Albuminbestimmung mittels RIA und ELISA besitzt eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität, ist aber mit einem hohen labortechnischen Aufwand verbunden.

### **1.2.5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, auch EIA (Enzyme-Immunoassay) genannt, ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches im Gegensatz zum RIA auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit nachfolgender Farbreaktion basiert (Feldt-Rasmussen, B. et al. 1985). Hierbei werden spezielle Antikörper genutzt, die sich an die nachzuweisende Substanz (z.B. Albumin) binden. Bei vollständiger Antigen-Antikörper-Bindung wird dann eine Farbreaktion hervorgerufen, die durch ein Enzym vermittelt wird, das entweder an das Antigen selbst oder den

Antikörper gebunden ist. Diese durch das Enzym katalysierte Reaktion dient dem Nachweis des Antigens in der Probe.

Die klassische ELISA-Technik beruht auf einem ähnlichen Prinzip, verwendet allerdings zwei Antikörper, die sich beide sehr spezifisch an unterschiedlichen Lokalisationen des Antigens binden. Der erste Antikörper (coating antibody) ist an einer Mikrotiterplatte fixiert und wird in die zu untersuchende Probe gegeben. Nach einer gewissen Inkubationszeit wird der zweite Antikörper (detection antibody) hinzugegeben, der durch ein Enzym oder durch eine alkalische Phosphatase markiert ist. Auch dieser bindet sich an das Antigen und es wird ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex hervorgerufen. Nach Zugabe eines Farbstoffes kann dieser durch das Enzym gespalten und aktiviert werden. Mit Hilfe eines Photometers lässt sich nun die Intensität dieser katalysierten Farbreaktion feststellen, die direkt proportional zu der Konzentration des in der Probe vorhandenen Antigens ist.

Eine alternative ELISA-Technik stellt der kompetitive Immunoassay dar. Bei dieser Methode werden markierte Antigene der Probe hinzugegeben, die im Folgenden mit dem nachzuweisenden Antigen um dieselben Bindungsstellen an dem Antikörper konkurrieren. Die gemessene Farbreaktion am Photometer ist hier indirekt zu der Antigenkonzentration in der Probe zu interpretieren.

Bilden jedoch die zu untersuchenden Antigene mit anderen Komponenten Immunkomplexe, die in ihrer Stabilität stärker sind, als die Antigen-Antikörper-Antigen-Moleküle, so können die Ergebnisse verfälscht werden, da der Antigenanteil in diesen Komplexen dem Nachweis mittels ELISA entgeht.

In der Gegenüberstellung von ELISA und RIA zum Nachweis von Antigenstrukturen ergeben sich keine vergleichbaren Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität. Dennoch kann die enzymgebundene Immunreaktion die radioaktiv markierten Antikörperreaktionen weitestgehend ersetzen.

### **1.2.6. Micral<sup>®</sup>-Test II Teststreifen**

Bei dem Micral<sup>®</sup>-Test II Teststreifen handelt es sich um einen immunologischen Schnellteststreifen zur Bestimmung von Albumin im Urin. Er ist befähigt, über eine Antigen-Antikörper-Reaktion Albumin an fixierte gold-markierte Antikörper im Teststreifen zu binden und darüber eine Verfärbung des Testfensters zu erreichen. Gemessen werden können Albuminwerte ab einer Konzentration von 20 mg/l im Urin und mittels unterschiedlicher Farbtintensitäten im Testfenster sind Werte von 0 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l und 100 mg/l unterscheidbar. In einer Studie nach Mogensen, C.E. et al. (1997), in der Urinproben von diabetischen Patienten mit dem Micral<sup>®</sup>-Test II Teststreifen untersucht werden, ergibt der Test eine Sensitivität von 96,7% bei einer Spezifität von 71% und ermöglicht bei einheitlicher Interpretation der Farbtintensitäten eine zuverlässige Alternative zur semiquantitativen Bestimmung von niedrigen Albuminkonzentrationen im Urin.

### **1.2.7. Microalbustix<sup>™</sup>**

Der Microalbustix<sup>™</sup> ist ein semiquantitativer Teststreifen mit zwei Reagenzfeldern, zur Bestimmung von Albumin und Kreatinin im Harn. Das Testfenster zur Bestimmung von Albumin im Urin enthält Sulfonphtalein hoher Affinität, das mit dem Albumin im Urin reagiert und eine Farbreaktion hervorruft. Diese ist bei konstantem pH-Wert ausschließlich auf das Vorhandensein von Albumin zurückzuführen.

Der Nachweis von Kreatinin beruht auf einer Peroxidase-ähnlichen Aktivität eines Kupfer-Kreatinin-Komplexes, der die Reaktion zwischen Diisopropylbenzylhydroperoxid und einem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin katalysiert und folglich eine Farbreaktion erzeugt.

Die Beurteilung der Ergebnisse für Albumin und Kreatinin erfolgt über einen Vergleich der Farbtintensitäten mithilfe einer Farbtabelle. Im Anschluss daran kann das Verhältnis von Albumin und Kreatinin durch eine beigefügte Tabelle abgelesen werden. Diese Methode erlaubt konsekutiv die Verwendung von Spontanurin versus 24-Stunden-Sammelurin, da der Albumin-Kreatinin-Quotient unabhängig von der Harnkonzentration ist.

Der Teststreifen vermag spezifisch Albumin im Urin in Konzentrationen von 20-40 mg/l festzustellen, weist aber in einer Studie von Comper, W.D. et al. (2003) eine nur geringe Sensitivität auf, frühzeitige Nierenschäden durch den Nachweis einer Mikroalbuminurie zu erkennen.

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wird der PreventID<sup>®</sup>-Albumin Teststreifen, ein immunchromatographischer in-vitro-Test zur Bestimmung von Albumin im Urin, auf seine diagnostische Fähigkeit untersucht. In diesem Zusammenhang soll geprüft werden, ob Sensitivität und Spezifität hinreichend gewährleistet sind, um die Zuverlässigkeit dieser diagnostischen Möglichkeit zu sichern.

Zur weiteren Prüfung dessen wird der Teststreifen in einer Gegenüberstellung mit anderen anerkannten diagnostischen Methoden, die bereits für den Nachweis einer Mikroalbuminurie verwendet werden, verglichen und eingeschätzt.



