

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Evaluation der Wertigkeit nicht-invasiver Biomarker der Nephronschädigung zur langfristigen Prognoseabschätzung nach Nierentransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ricarda Merle Hinz (geborene Viol)

aus Berlin, geboren in Leer

Datum der Promotion: 13.12.2019

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Die akute Nierenschädigung.....	1
1.2 Die Nierentransplantation.....	3
1.3 Die akute Nierentransplantatschädigung.....	4
1.4 Die chronische Transplantatnephropathie.....	5
1.5 Der Transplantatverlust.....	6
1.6 Patientenüberleben nach Nierentransplantation.....	9
1.7 Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin.....	11
1.7.1 NGAL in klinischen Studien.....	12
1.8 Calprotectin.....	14
1.8.1 Calprotectin in klinischen Studien.....	15
1.9 Zielstellung.....	17
2 Methoden.....	18
2.1 Studiendesign.....	18
2.1.1 NGAL-Bestimmung.....	19
2.1.2 Calprotectin-Bestimmung.....	19
2.1.3 Kreatinin- und Proteinurie-Bestimmung.....	20
2.2 Statistische Analysen.....	20
3 Ergebnisse.....	22
3.1 Fallzahl.....	22
3.2 Patientencharakteristika.....	23
3.3 Testcharakteristika.....	26
3.4 Prädiktionsmodelle.....	30
3.5 Überlebenszeitanalysen.....	32

4	Diskussion.....	37
5	Literaturverzeichnis	43
	Eidesstattliche Versicherung	57
	Curriculum Vitae	58
	Danksagung.....	59

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund Chronischer Funktionsverlust mit vorzeitigem Nierentransplantatversagen stellt die größte Herausforderung in der nephrologischen Transplantationsmedizin dar. Einige Transplantatempfänger können subklinische Episoden akuter Nierenschädigung aufweisen, die sie für einen Nierentransplantatfunktionsverlust und schließlich Transplantatversagen prädisponieren. Derzeit gibt es keine etablierte Methode, um subklinische Nierenschädigungen bei Transplantierten zu detektieren. Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) und Calprotectin wurden als Biomarker für akute Tubulusschädigung in mehreren klinischen Situationen evaluiert. Wir untersuchen NGAL und Calprotectin im Urin und Blut von stabilen Nierentransplantierten, um ihren prognostischen Wert zu ermitteln und die Vorhersage von Transplantatverlust und Tod zu verbessern.

Methodik Wir führten eine monozentrische, prospektive Beobachtungsstudie durch, in der 709 stabile Nierentransplantierte aus unserer Transplantationsambulanz mindestens zwei Monate nach Nierentransplantation von April bis September 2013 eingeschlossen wurden. Sie wurden im Median 58 Monate [IQA 57 – 59] in Bezug auf die Endpunkte Tod und Transplantatverlust nachverfolgt. Klinische Daten, Laborparameter, Plasma- und Urin-NGAL sowie -Calprotectin wurden zum Zeitpunkt des Einschlusses bestimmt. Die Fähigkeit von NGAL und Calprotectin zur Vorhersage von Transplantatverlusten wurde untersucht und in Bezug gesetzt zu konventionellen Prädiktoren.

Ergebnisse Während des Follow-Ups entwickelten 118 (16,6 %) Patienten den kombinierten Endpunkt aus Tod und Transplantatverlust, wovon 84 (11,8 %) Patienten verstarben und 49 (6,9 %) einen Tod-zensurierten Transplantatverlust erlitten. Das mediane Plasma-NGAL (pNGAL) innerhalb der gesamten Kohorte betrug 189 ng/ml [IQA 130 - 257]; bei Patienten, die später Tod-zensurierten Transplantatverlust erfuhren, 304 ng/ml [IQA 234,5 - 358] ($p < 0,001$). *Time-dependent Receiver Operating Characteristics* ergaben für Transplantatverlust nach drei, vier und fünf Jahren *Area Under the Curve*-Werte für pNGAL von 0,795 - 0,811 und für Serumkreatinin (sKrea) von 0,85 - 0,892. Der abgeleitete Cut-Off-Wert für pNGAL von 230 ng/ml besitzt für Transplantatverlust nach fünf Jahren eine Sensitivität von 82,33 % und Spezifität 70,86 %; der Cut-Off-Wert für sKrea von 1,75 mg/dl eine Sensitivität von 79,9 % und Spezifität 71,35 %. Univariate und multivariate Cox-Regressionsanalysen sowie *Competing Risk*-Analysen zeigten, dass pNGAL einen unabhängigen Prädiktor für den kombinierten Endpunkt, Tod und Transplantatverlust darstellt, er allerdings nur in der Vorhersage von Tod gegenüber sKrea überlegen ist. Für die Prädiktion von Transplantatverlust innerhalb von fünf Jahren konnte ein Zusatznutzen für pNGAL in Kombination mit erhöhten sKrea-Werten $\geq 1,75$ mg/dl gezeigt

werden: Nierentransplantierte mit einem zusätzlich erhöhten pNGAL ≥ 230 ng/ml haben ein signifikant höheres kumulatives Risiko von 21,9 % (95% KI, 1,161 – 1,294) im Vergleich zu Patienten mit isolierter sKrea-Erhöhung (kumulative Hazard Rate 2,52%; 95% KI, 1,006 – 1,097; $p < 0,001$).

Schlussfolgerung Zusammenfassend bietet unsere Studie Hinweise darauf, dass eine Bestimmung von pNGAL zum Zeitpunkt der stabilen Transplantatfunktion dazu beitragen kann, schlechte langfristige Ergebnisse nach Nierentransplantation vorherzusagen.

ABSTRACT

Chronic loss of function with premature kidney transplant failure represents the greatest challenge in kidney transplantation. Some kidney transplant recipients (KTR) may have subclinical episodes of acute kidney injury predisposing them to functional decline and graft loss. Currently, there is no established method for detecting subclinical kidney injury in KTR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and calprotectin have been evaluated as biomarkers of acute renal tubular damage. Here, we analysed NGAL and calprotectin levels in stable KTR to evaluate their utility in predicting graft loss and death.

We conducted a monocentric, prospective observational study enrolling 709 stable KTR from our transplant outpatient clinic at least two months after renal transplantation from April to September 2013. They were followed up in median 58 months [IQR 57 – 59]. Baseline characteristics, standard laboratory values, plasma and urine NGAL as well as plasma and urine calprotectin levels were determined at the time of inclusion.

During follow-up, 49 patients experienced death-censored loss of transplant and 84 patients suffered all-cause death amounting to 118 cases displaying a composite outcome of death or loss of transplant. The median plasma NGAL (pNGAL) within the entire cohort was 189 ng/ml [IQR 130 - 257]. Patients who later experienced death-censored graft loss had a pNGAL of 304 ng/ml [IQR 234.5 - 358] ($p < 0.001$). Time-dependent Receiver Operating Characteristics analyses for graft loss after three, four and five years yielded Area Under the Curve values of 0.795 - 0.811 for pNGAL and of 0.85 - 0.892 for serum creatinine (sCrea). pNGAL at a cut-off of 230 ng/ml displayed a sensitivity of 82.33 % and a specificity of 70.86 % for graft loss after five years, while sCrea at a cut-off of 1.75 mg/dl displayed a sensitivity of 79.9 % and a specificity of 71.35 %. Univariate and multivariate Cox regression analyses as well as competing risk analyses showed that pNGAL is an independent predictor of the combined endpoint, death and graft loss, and superior to sCrea in predicting death. To predict graft loss within five years, an additional benefit for pNGAL in combination with elevated sCrea values ≥ 1.75 mg/dl could be demonstrated: KTR with an additionally elevated pNGAL ≥ 230 ng/ml had a significantly higher cumulative risk of 21.9 % (95 % CI, 1.161 – 1.294) compared to patients with an isolated sCrea elevation (cumulative hazard rate 2.52 %; 95 % CI, 1.006 – 1.097; $p < 0.001$).

In sum, our study suggests that an evaluation of pNGAL at the time of stable graft function may help to predict poor long-term outcomes in KTR.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aHR	adjustierte Hazard Ratio / Rate
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i> (= akute Nierenschädigung)
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
ANV	Akutes Nierenversagen
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CAI	<i>Chronic Allograft Injury</i> (= chronische Transplantatschädigung)
CAN	<i>Chronic Allograft Nephropathy</i> (= chronische Transplantatnephropathie)
CNI	Calcineurin-Inhibitor
DGF	<i>Delayed Graft Function</i> (= verzögerte Transplantatfunktionsaufnahme; Notwendigkeit mindestens einer postoperativen Dialyse in den ersten sieben Tagen nach der Transplantation)
DSA	donorspezifische Antikörper
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ECD	<i>Expanded Criteria Donors</i> (= hirntote Spender ≥ 60 Jahre alt oder zwischen 50 und 59 Jahre alt mit mindestens zwei der folgenden Kriterien: Vorgeschichte mit arterieller Hypertonie, letztes Serumkreatinin $> 1,5$ mg/dl oder zerebrovaskuläre Todesursache)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure / <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
eGFR	<i>estimated Glomerular Filtration Rate</i> (= geschätzte/errechnete Glomeruläre Filtrationsrate)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERA – EDTA	<i>European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H-FABP	<i>Heart Fatty Acid Binding Protein</i>
HLA	Humane Leukozyten Antigen
HR	Hazard Ratio / Rate
IF/TA	interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie
IgA	Immunglobulin A
IQA / IQR	Interquartilsabstand / <i>interquartile range</i>
kDa	Kilodalton
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG	Körpergewicht
kHR	kumulative Hazard Ratio / Rate
KI / CI	Konfidenzintervall / <i>confidence interval</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule 1</i>
KTFS	<i>Kidney-Transplant-Failure-Score</i>
KTR	<i>Kidney Transplant Recipient</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LR+	positive/r Likelihood Ratio/Likelihoodquotient

LR-	negative/r Likelihood Ratio/Likelihoodquotient
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
NGAL	Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NPW	negativ prädiktiver Wert
NT-proBNP	N-terminale natriuretische Peptide vom B-Typ
NTx	Nierentransplantation
p	Signifikanzwert
pCalpro	Plasma-Calprotectin
pCalprotectin	Plasma-Calprotectin
pNGAL	Plasma-Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
PPW	positiv prädiktiver Wert
PRA	<i>Panel Reactive Antibody</i>
RIFLE	<i>Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function and End-stage kidney disease</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
SD	Standardabweichung
Sens	Sensitivität
Spez	Spezifität
sKrea / sCrea	Serumkreatinin / <i>serum creatinine</i>
sKreatinin	Serumkreatinin
t0	Zeitpunkt des Einschlusses
<i>timeROC</i>	<i>time-dependent Receiver Operating Characteristics</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TnT	Troponin T
uCalpro	Urin-Calprotectin
uCalprotectin	Urin-Calprotectin
uNGAL	Urin-Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
VS-NTX	Validierungsstudie Nierentransplantation

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1:</i>	<i>Schematische Darstellung der Bildungsorte von NGAL und Calprotectin im Nephron bei akuter Tubulusschämie.</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 2:</i>	<i>Flussdiagramm zur Bildung der Studienkohorte in der VS-NTX-Studie.</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 3:</i>	<i>Verteilung der Konzentrationen von pNGAL (A-C), pCalprotectin (D-F), sKreatinin (G-I) in den Kohorten mit und ohne Endpunkt (kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust).</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 4:</i>	<i>timeROC-Kurven und AUC-Werte.</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 5:</i>	<i>Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 6:</i>	<i>Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für Risikogruppen.</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 7:</i>	<i>Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für Tod-zensurierten Transplantatverlust in Abhängigkeit des Transplantatalters.</i>	<i>34</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Schweregradeinteilung des akuten Nierenversagens nach KDIGO</i>	<i>2</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Ein- und Ausschlusskriterien der VS-NTX-Studie.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Patientencharakteristika bei Einschluss und nach Endpunkten.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Testcharakteristika für den Cut-Off-Wert von pNGAL 230 ng/ml und sKrea 1,75 mg/dl in Abhängigkeit der Überlebenszeit (3, 4, 5 Jahre) bezogen auf die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Univariate Cox-Regressionen für die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod- zensurierter Transplantatverlust ausgewählter klinisch signifikanter Parameter. ...</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>Prädiktionsmodelle der multiplen Cox-Regression für die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust und Competing Risk - Analyse für Transplantatversagen.....</i>	<i>31</i>

1 EINLEITUNG

1.1 DIE AKUTE NIERENSCHÄDIGUNG

Die akute Nierenschädigung (*Acute Kidney Injury* = AKI) ist ein häufiges Problem bei hospitalisierten Patienten: Geschätzt 5 – 10 % von allen und bis zu 40 % der schwerkranken Patienten erleben eine Episode akuter Nierenschädigung während ihres Krankheitsverlaufes (Haase-Fielitz et al. 2014). Sie ist definiert als die abrupte (z.B. innerhalb von 48 h) und anhaltende Abnahme der Nierenfunktion, wodurch es zur Anreicherung von harnpflichtigen Substanzen, Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt sowie Säure- und Base-Haushalt kommt. In der aktuellen klinischen Praxis basiert die Diagnose und Klassifizierung von AKI-Stadien auf dem Serumkreatinin, der davon abgeleiteten und errechneten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) sowie der Urinausscheidung (Cappuccilli et al. 2018).

Dabei gab es lange Zeit keine einheitliche Definition, ab welchem Ausmaß des Anstieges bzw. Verlustes der o.g. Parameter ein akutes Nierenversagen (ANV) zu diagnostizieren war. Daher wurde 2004 durch die *Acute Dialysis Quality Initiative* die sogenannte RIFLE-Klassifikation festgelegt, die basierend auf dem Serumkreatininanstieg und dem Diureserückgang die Schweregrade *Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function and End-stage kidney disease* eingeteilt hat. So definiert *Risk* z.B. den 1,5-fachen Anstieg des Serumkreatinins oder Abfall der eGFR > 25 % oder Urinausscheidung < 0,5 ml/kg/h für die Dauer von 6 h. Dies muss innerhalb von ein bis sieben Tagen aufgetreten sein und für mind. 24 h bestehen bleiben (Bellomo et al. 2004). Später wurde mit dem Ziel der verbesserten Sensitivität durch das *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) die RIFLE-Klassifikation modifiziert (Mehta et al. 2007). Dabei entsprechen die AKIN-Stadien 1, 2 und 3 im Wesentlichen den RIFLE-Stadien *Risk, Injury* und *Failure*, allerdings ist das Zeitfenster für die Diagnosestellung auf 48 h verkürzt und bereits das AKIN-Stadium 1 bei einem Kreatininanstieg von nur 0,3 mg/dl erfüllt. Da sich im weiteren Verlauf eine gewisse Diskrepanz der beiden Klassifikationen abzeichnete, wurden 2012 die aktuell gültigen internationalen Leitlinien durch die *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) – Gruppe veröffentlicht (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group 2012). Hierbei wurden beide Systeme kombiniert (siehe Tabelle 1) (Lopes & Jorge 2013):

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des akuten Nierenversagens nach KDIGO: (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group 2012).

Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um 0,3 mg/dl (innerhalb von 48 h) oder 1,5- bis 1,9-facher Anstieg (innerhalb von 7 Tagen)	< 0,5 ml/kgKG/h für 6 - 12 h
2	2- bis 2,9-facher Anstieg	< 0,5 ml/kgKG/h für ≥ 12 h
3	≥ 3-facher Anstieg oder Anstieg auf ≥ 4 mg/dl oder Beginn einer Nierenersatztherapie oder Patienten < 18 Jahre: Abfall der eGFR auf < 35 ml/min/1,73 m ²	< 0,3 ml/kgKG/h für ≥ 24 h oder Anurie für ≥ 12 h

Die Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung ist sehr heterogen. Es lassen sich drei ätiologische Gruppen abgrenzen: das prärenale, intrarenale oder intrinsische und postrenale Nierenversagen (Kuhlmann et al. 2015; Singer 2013).

Beim prärenalen Nierenversagen kommt es zu einer unzureichenden renalen Perfusion, ohne dass dies zu einer strukturellen Schädigung der Niere führt. Durch Verbesserung des absoluten oder relativen Volumenmangels kann die Nierenfunktion schnell wiederhergestellt werden. In der 1996 veröffentlichten epidemiologischen Madrid-Studie war eine prärenale Ursache bei 21 % der Patienten für akutes Nierenversagen verantwortlich (Liaño & Pascual 1996).

Beim intrarenalen oder intrinsischen Nierenversagen kommt es zu einer direkten Schädigung der Nierengefäße, -glomeruli, -tubuli oder dem -interstitium, welche oftmals über mehrere Wochen andauert und einer passageren Nierenersatztherapie bedürfen kann. Die Ursachen können vielfältig und multifaktoriell sein. In der o.g. Madrid-Studie war akute Tubulusnekrose durch prolongierte Mangel durchblutung die häufigste Ursache für akutes intrinsisches Nierenversagen (45 %) (Liaño et al. 1996).

Kommt es zu einem akuten Nierenversagen aufgrund einer Abflussbehinderung in den ableitenden Harnwegen, bezeichnet man dies als postrenale Genese. In der Madrid-Studie betrug die Häufigkeit des postrenalen Nierenversagens 10 % (Liaño et al. 1996). Durch Beseitigung des Abflusshindernisses ist das Nierenversagen schnell reversibel.

Ein postrenales Nierenversagen ist einfach mit einem bildgebenden Verfahren feststellbar. Wohingegen die Differenzierung zwischen prärenalem und intrarenalem Nierenversagen schwierig und meist nur retrospektiv möglich ist. In der Klinik werden verschiedene Parameter zur Differentialdiagnostik benutzt: u.a. die fraktionelle Natrium- oder Harnstoff-Exkretion, die Urinosmolalität, die Harnstoff/Kreatinin-Ratio, das Urinsediment oder als Ultima-Ratio die histologische Sicherung mittels Nierenbiopsie.

Die Prognose des akuten Nierenversagens ist abhängig von der Ätiologie und des Schweregrades: So zeigten Susantitaphong et al. in einem systematischen Review mit fast

50 Millionen Patienten eine Mortalität von 23,9 % bei Betroffenen (Susantitaphong et al. 2013). Bagshaw et al. stratifizierten eine heterogene Population von über 120.000 Patienten mit einem akuten Nierenversagen nach RIFLE-Kriterien. Sie stellten fest, dass die Mortalität mit steigender RIFLE-Stufe höher wird (Odds-Ratio: *Risk* 1,58, *Injury* 2,54 und *Failure* 3,22) (Bagshaw et al. 2008). Patienten mit intrarenalem Nierenversagen haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit prärenalem oder postrenalem Nierenversagen: In der Madrid-Studie hatten Patienten mit intrarenalem Nierenversagen eine Mortalität von 60 %, Patienten mit prärenalem Nierenversagen 35 %, Patienten mit postrenalem Nierenversagen 27 % (Liaño et al. 1996). In der BEST-Studie an mehr als 29.000 Patienten auf Intensivstationen lag die Mortalität von Patienten mit schwerem akutem Nierenversagen bei 60,3 %. 13,5 % der Überlebenden blieben bei der Entlassung dialyseabhängig (Uchino et al. 2005). Auch Patienten, bei denen sich die Nierenfunktion wieder ganz oder teilweise erholt, haben eine schlechte Langzeitprognose: Das Risiko, in den nächsten Jahren eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln, ist neunfach und dialysepflichtig zu werden, dreifach erhöht. Vor allem Patienten mit einer vorbestehenden Nierenerkrankung haben ein sehr hohes Risiko, nach einer Episode einer akuten Nierenschädigung rasch terminal niereninsuffizient zu werden (Lhotta 2018).

1.2 DIE NIERENTRANSPLANTATION

Die Nierentransplantation (NTx) ist die bevorzugte Nierenersatztherapie für die meisten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Eine erfolgreiche NTx verbessert die Lebensqualität und reduziert das Sterberisiko für die Mehrheit der Patienten im Vergleich zur Dialysetherapie (Beckmann et al. 2009). Im Jahr 2017 warteten in Deutschland 7620 Patienten auf eine neue Niere bzw. waren auf der aktiven Warteliste. Die häufigsten Diagnosen, die eine NTx notwendig machen, waren 2017 die polyzystische sowie die nicht spezifizierte chronische Nierenkrankheit und das chronische nephritische Syndrom (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2018b). Es wurden 2017 in Deutschland 1364 Organe von hirntoten Spendern und 557 Nieren von Lebendspendern transplantiert. Dies ist im Vergleich zu den Vorjahren eine deutlich gesunkene Anzahl, da die Bereitschaft zur Organspende in den letzten Jahren von 2012 bis 2017 um etwa 25 % abgenommen hat (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2018c). Derzeit beträgt die Wartezeit im Durchschnitt etwa sechs Jahre (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2018a). Nicht nur das Alter der zu Transplantierenden, sondern auch das Alter und damit die Qualität der postmortalen Organspenden hat durch den Organmangel zugenommen. Für Patienten über 65 Jahre wurde daher ein spezielles Verteilungsverfahren eingeführt: Im Rahmen des sogenannten „*Old-for-old*“-Programms erhalten Patienten Spendernieren, die ebenfalls älter als 65 Jahre sind. Der demographische Wandel hat außerdem dazu geführt, dass die häufigste Ursache von Transplantatversagen der Patiententod mit funktionierendem Transplantat ist. Die Allokation der Organe von hirntoten Spendern erfolgt über Eurotransplant, eine Vermittlungsstelle für

Organspenden in den Benelux-Ländern, Deutschland, Österreich, Slowenien, Kroatien und Ungarn. Dabei werden u.a. die Wartezeit (ab Beginn der Dialyse) sowie die Übereinstimmung der Gewebsverträglichkeitsmerkmale (HLA-Merkmale) von Spender und Empfänger, das Herkunftsland von Spender und Empfänger sowie die Entfernung zwischen dem Ort der Organentnahme und dem Transplantationszentrum berücksichtigt. Bei Lebendspenden sind sowohl verwandte als auch nicht verwandte sowie Blutgruppen-inkompatible Paarungen möglich. Die NTx wird heterotop durchgeführt, das heißt, dass das Spenderorgan nicht an die Stelle einer eigenen Niere transplantiert, sondern außerhalb des Peritoneums im Bereich des Beckens platziert wird. Durch die Weiterentwicklungen in der immunsuppressiven Therapie (Calcineurin-Inhibitoren (CNI), Proliferationshemmer) konnten Abstoßungsreaktionen immer besser abgewendet und damit das Transplantatüberleben verlängert werden. Jedoch müssen die Spiegel der CNI regelmäßig kontrolliert werden, da sie neben einer erhöhten Infektanfälligkeit und einem erhöhten Malignomrisiko auch eine direkte nephrotoxische Nebenwirkung mit sich bringen (Kuhlmann et al. 2015).

1.3 DIE AKUTE NIERENTRANSPLANTATSCHÄDIGUNG

Die AKI spielt nach einer NTx sowohl in der frühen postoperativen Phase als auch im Langzeitverlauf eine essentielle Rolle und geht mit einer Verschlechterung des Langzeitüberlebens des Nierentransplantats einher (Nagarajan et al. 2017; Perico et al. 2004). Gerade in der frühen postoperativen Phase kommt es häufig, 2 - 50 % nach Kadaverspende und 4 - 10 % nach Lebendspende (Perico et al. 2004) zu einer akuten, meist reversiblen Nierenschädigung als Folge eines Ischämie-Reperfusionsschadens. Klinisch zeigt sich dies mit einer Oligurie oder Anurie, Ausbleiben der Entgiftungsfunktion und damit Notwendigkeit mindestens einer postoperativen Dialyse in den ersten sieben Tagen nach Transplantation, was auch als *Delayed Graft Function* (DGF) bezeichnet wird (Koning et al. 1997). Histologisch führt dies zu einer akuten Tubulusnekrose, wodurch eine Immunantwort getriggert wird, die sowohl mit einer vermehrten Bildung von donorspezifischen Antikörpern und mit humoralen Rejektionen einhergeht, als auch zelluläre Rejektionen zur Folge haben kann (Fuquay et al. 2013).

Kommt es im Verlauf der ersten drei Monate nach Transplantation zu einer akuten Transplantatverschlechterung, dann ist in der Regel vom Vorliegen einer akuten Rejektion, eines Harnwegsinfektes, einer medikamentös-toxischen Genese oder urologischen Komplikation (z.B. Harnabflussstörungen, Lymphozele, Urinleck, arterielle oder venöse Durchblutungsstörungen) auszugehen (Kuhlmann et al. 2015). Zur rechtzeitigen Erkennung einer schnellen Verschlechterung der Transplantatfunktion sind in den ersten Wochen sehr engmaschige Kontrollen der Retentionswerte, der Urinmenge sowie der Perfusion mittels Sonographie Teil der leitliniengerechten Nachsorge (Kidney Disease: Improving Global

Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Außerdem muss auch in manchen Fällen an die mögliche Rekurrenz der Nierengrunderkrankung (z.B. primäre fokale segmentale Glomerulosklerose, IgA-Nephropathie, Thrombotische Mikroangiopathie) gedacht werden (Kuhlmann et al. 2015).

Allerdings kommt es gerade bei Nierentransplantierten häufig zu subklinischen Verschlechterungen des Nierentransplantats. Hierbei stellen Kreatinin- und Proteinuriemessungen keinen ausreichend frühzeitigen Detektionsmarker dar, da sie erst nach einer bereits abgelaufenen Parenchymschädigung den Funktionsverlust des Transplantats anzeigen. Kommt es nämlich zu einer anhaltenden Dysfunktion ohne rechtzeitiges Ergreifen weiterer diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, kann es zu einem irreversiblen Verlust der Transplantatfunktion und schließlich zum Versagen des Nierentransplantats führen (Kadambi et al. 2018).

1.4 DIE CHRONISCHE TRANSPLANTATNEPHROPATHIE

Der chronische Funktionsverlust mit vorzeitigem Versagen von Nierentransplantaten stellt die größte Herausforderung in der nephrologischen Transplantationsmedizin dar. Als häufigste Ursache hierfür hat sich die sogenannte chronische Transplantatnephropathie (*Chronic Allograft Nephropathy* = CAN) fest etabliert. Darunter versteht man das Syndrom aus langsamer Funktionsverschlechterung, die teils nach dem ersten oder nach mehreren Jahren beginnt und sich in einer langsam über Wochen und Monate verschlechternden glomerulären Filtrationsrate, damit einhergehender Zunahme der Proteinurie und Verschlechterung der arteriellen Hypertonie klinisch manifestiert. Histologisch ist dies mit einer interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie (IF/TA) assoziiert (Kuhlmann et al. 2015). Lange bestand die Annahme, dass dieser Prozess multifaktoriell, unaufhaltsam und keiner kausalen Therapie zugänglich sei (Mengel 2010). Außerdem wurde der Begriff gleichbedeutend mit „chronischer Rejektion“ benutzt, auch wenn diese nicht histologisch gesichert war und zudem auch nur eine mögliche von vielen Ursachen der chronischen Funktionsabnahme darstellt. Nachdem Studien gezeigt hatten, dass sich in > 80 % ein spezifischer Krankheitsprozess als Ursache für die chronische Transplantatschädigung identifizieren lässt (El-Zoghby et al. 2009; Halloran et al. 1999), wurde dieser missverständliche Begriff 2005 auf der achten Banff-Konferenz der Nierentransplantatpathologie durch den Begriff der chronischen Transplantatschädigung (*Chronic Allograft Injury* = CAI) ersetzt. Dieser bedeutet, dass das o.g. klinische Syndrom der schleichenden Transplantatverschlechterung vorliegt und histologisch eine irreversible IF/TA gesichert wurde, die in verschiedene Grade eingeteilt wird, aber deren Ätiologie damit nicht geklärt ist (Solez et al. 2007). Ursachen für eine CAI sind sowohl immunologisch als auch nicht immunologisch. Unter immunologisch versteht man akute oder chronische, zelluläre oder humorale Rejektionen, die klinisch sowie auch subklinisch verlaufen können. Die

Immunantwort des Organismus eines Empfängers beginnt zum Zeitpunkt der Anastomosierung während der Transplantation. Die Größe des Ischämie-Reperfusionsschadens im Transplantat triggert zelluläre Rejektionen sowie die Bildung von donorspezifischen Antikörpern, wobei gleichzeitig die initiale immunologische Kompatibilität eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Immunreaktion spielt (Kuhlmann et al. 2015). Nicht immunologische Faktoren beinhalten zum einen die funktionelle Reserve des Organs, welche u.a. durch die Vorerkrankungen des Spenders bedingt ist, zum anderen die Begleiterkrankungen des Empfängers, so z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Fettstoffwechselstörungen, außerdem toxische Schäden durch die Immunsuppression (CNI-Toxizität), Therapieadhärenz des Empfängers, rezurrenente oder de-novo-Glomerulonephritiden und Infektionen, darunter die Polyomanephropathie (Riella et al. 2016). Das Zusammenspiel dieser multiplen Faktoren führt unbehandelt zu irreversiblen Transplantatschäden. Es gibt viele Studien, die reduzierte oder andere Immunsuppressionskonzepte vorschlagen (Birnbaum et al. 2009; Sawinski et al. 2016), allerdings bleibt die optimale Langzeitimmunsuppression undefiniert (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Konservative Maßnahmen zur Senkung des kardiovaskulären Risikos stellen darüber hinaus eine wichtige Komponente in der Verhinderung der chronischen Transplantatverschlechterung dar (Riella et al. 2016). Bis heute sind moderate bis schwere CAI bereits bei einem Viertel der Transplantierten nach dem ersten Jahr und bei mehr als 90 % nach zehn Jahren vorhanden. Schlussfolgernd sind weiterhin verbesserte Früherkennungs- und Interventionsstrategien nötig, um der Entwicklung einer chronischen Transplantatnephropathie vorzubeugen bzw. sie hinauszuzögern (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Serón et al. 2008)

1.5 DER TRANSPLANTATVERLUST

Das Risiko des Transplantatverlustes wird traditionell in eine frühe, risikoreiche und eine spätere Periode mit konstant niedrigem Risiko unterteilt (Vella 2018). Daher lag in den Anfangszeiten der Nierentransplantation das Hauptaugenmerk auf dem Verhindern der akuten Rejektion in den ersten Monaten nach Transplantation. Durch die Verbesserungen der Immunsuppression und der medizinischen Nachsorge in den letzten drei Jahrzehnten wurde das Transplantatüberleben in den ersten ein bis drei Jahren nach Transplantation stetig verbessert (El-Zoghby et al. 2009). So liegt 2017 die Ein-Jahres-Transplantatüberlebensrate für Leichenspenden bei 96 % und nach drei Jahren bei 92 % (IQTIG - Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen 2018). Jedoch konnte durch die verbesserte Immunsuppression kein positiver Einfluss auf den mittel- bis langfristigen Organverlust genommen werden (Meier-Kriesche et al. 2004; Stallone et al. 2005). Aus diesem Grund hat sich der Schwerpunkt auf die langfristige Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion verschoben

(Halloran et al. 1999). Ganzheitlich betrachtet ist Tod kardiovaskulärer Genese, gefolgt von Infektionen und Malignomen als Todesursache, mit funktionierendem Transplantat zu 50 % die Erklärung für Transplantatversagen (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Etwa 20 % der Patienten auf der Transplantationswarteliste sind Patienten mit Zustand nach Nierentransplantatversagen (Kuhlmann et al. 2015). Der häufigste Grund für Tod-zensuriertes Transplantatversagen ist die oben beschriebene chronische Transplantatschädigung, gefolgt von akuter Rejektion und Rekurrenz der Grunderkrankung (El-Zoghby et al. 2009). Laut der „*Collaborative Transplant Study*“ der Universität Heidelberg funktionieren Lebendspendernieren nach fünf Jahren zu 86 %; Kadaverspenden haben eine Fünf-Jahres-Transplantatfunktionsrate von 76 % (Institut für Immunologie der Universität Heidelberg 2019). Generell variieren die Transplantatüberlebensraten unter den verschiedenen ethnischen Gruppen, welches teilweise durch den unterschiedlichen Zugang zu medizinischer Versorgung oder das ungleiche Vorhandensein von Risikofaktoren erklärt werden kann (Higgins & Fishman 2006). Ein Risiko für Transplantatversagen im ersten Jahr nach Transplantation stellen u.a. die immunologische Sensibilisierung angegeben durch *Panel Reactive Antibody* in Prozent (PRA %), das Durchmachen von DGF, die Anzahl und der Schweregrad von Rejektionsepisoden, Zweit- und Dritttransplantationen, die Art der Spende (Kadaver versus Lebend), Organe von Spendern höheren Alters (> 65 Jahre), Vorerkrankungen des Spenders, die Anzahl der Humane Leukozyten Antigen (HLA) – Diskrepanzen und das Entlassungskreatinin direkt nach Transplantation dar (Kadambi et al. 2018). Eine klare Abgrenzung zu Risikofaktoren für das Langzeitüberleben ist jedoch nicht möglich (Gómez et al. 2013). Es bestehen Evidenzen für prä-, peri- und postoperative Parameter, die sich einerseits gegenseitig beeinflussen und andererseits auf verschiedene Art und Weise einen negativen Effekt auf das Kurzzeit- sowie Langzeit-Transplantatüberleben haben (Vella 2018). So bedingen beispielhaft die präoperative Immunsisierung eines Patienten, das akzeptierte Ausmaß der HLA-Diskrepanzen für das jeweilige Organ, welches je nach Spender, eine große oder geringere substanzielle Organreserve mitbringt, die Länge der Kalt- und Warmischämiezeit und damit die Ausprägung des Ischämie-Reperfusionsschadens, die Ausweitung der akuten Tubulusnekrose sowie der Immunreaktion und damit das zunächst bestmögliche Funktionsniveau gemessen anhand des Serumkreatinins in den ersten Wochen nach Transplantation. Hinzu kommt der einerseits vor Rejektionen schützende und andererseits nephrotoxische Effekt der Immunsuppression post transplantationem, der außerdem abhängig von der Patientencompliance ist. Jede dieser Variablen trägt zur Verhinderung oder Begünstigung einer akuten oder chronischen Rejektion und damit einhergehenden chronischen Transplantatschädigung bei (Almond et al. 1993).

Wie bereits o.g. tragen nicht nur immunologische Faktoren zu einer chronischen Transplantatverschlechterung und damit über kurz oder lang zum Transplantatverlust bei: Kleinsteuber et al. konnten 2018 zeigen, dass vorbestehende Begleiterkrankungen des

Empfängers, wie z.B. chronische Herzinsuffizienz und periphere arterielle Verschlusskrankheit einen unabhängigen negativen Einfluss auf Tod-zensuriertes Transplantatüberleben haben (Kleinsteuber et al. 2018). Mange et al. veröffentlichten 2000, dass nach Anpassung an die Baseline-Nierenfunktion gemessen ein Jahr nach der Transplantation das relative Risiko eines Transplantatversagens um 1,3 für jede 10 mmHg - Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks steigt (Mange et al. 2000). Darüber hinaus konnte 2015 durch Naik et al. in den Vereinigten Staaten an über 100.000 Patienten ein erhöhtes Risiko für Transplantatversagen durch steigende BMI-Werte festgestellt werden (Naik et al. 2016). Des Weiteren gibt es viele Arbeiten auf der Suche nach messbaren Prädiktoren im Verlauf der Transplantationsnachsorge: So konnte u.a. gezeigt werden, dass das Kreatinin ein Jahr nach Transplantation ein guter Prädiktor für Langzeit-Transplantatüberleben ist (Hariharan et al. 2002 (11-Jahres-Follow-Up); Salvadori et al. 2006 (5-Jahres-Follow-Up)).

Auch Proteinurie auf verschiedene Art und Weise sowie mit unterschiedlichen Cut-Off-Werten gemessen, stellt einen unabhängigen Prädiktor für Transplantatverlust dar (Halimi et al. 2005, 2007). So zeigten Nauta et al. 2011, dass in einem medianen Follow-Up von 4,7 Jahren die AUC für Transplantatverlust von Albuminurie (0,78; [95 % Konfidenzintervall (KI); 0,59 - 0,76]) höher als von Proteinurie (0,67; [95 % KI, 0,59 - 0,76]; $p < 0,001$) im Sammelurin von stabilen Nierentransplantierten ist (Nauta et al. 2011). Weiner et al. beschrieben 2019 genauer, dass Albumin/Kreatinin-Ratios von 30 bis 299 und ≥ 300 mg/g (Referenzbereich bis < 10 mg/g) stark mit Transplantatverlust assoziiert sind (Hazard Ratios (HR) von 3,40 [95 % KI, 2,19 - 5,30] und 9,96 [95 % KI, 6,35 - 15,62]) (Weiner et al. 2019).

Aufgrund der vielfältigen Einflussgrößen auf Transplantatversagen veröffentlichten wiederum andere Autoren statistisch abgeleitete Prädiktionsscores, um die klinische Entscheidungsfindung zu vereinfachen und frühzeitige Interventionen zu ermöglichen. Foucher et al. publizierten 2010 den *Kidney-Transplant-Failure-Score* (KTFS), der eine Reihe von acht akzeptierten Prä- und Posttransplantationsrisikofaktoren (Alter und Geschlecht des Empfängers, Anzahl der Transplantationen, Kreatinin des Donors, Kreatinin drei Monate und ein Jahr nach Transplantation, Proteinurie ein Jahr nach Transplantation, akute Rejektion im ersten Jahr nach Transplantation) für den Verlust des Transplantats berücksichtigt und die Fähigkeit hat, das Transplantatversagen nach acht Jahren vorherzusagen (AUC-ROC 0,78) und die Patienten in eine Hoch- und Niedrig-Risiko-Gruppe einzuteilen (Foucher et al. 2010). Allerdings gaben Kaboré et al. 2017 in ihrem Review, das 39 Scores einbezieht, zu bedenken, dass bisher kein ideales Modell für den klinischen Alltag entwickelt werden konnte, da erhebliche Unterschiede in der Definition des Versagens des Transplantats, der Prädiktoren und Methoden, die für die Modellentwicklung und -validierung verwendet wurden, sowie Ungleichheiten im zeitlichen Ursprung der Erhebung der Parameter und im Zeithorizont der Vorhersageleistungen bestehen (Kaboré et al. 2017).

Betrachtet man die Ätiologie des Transplantatverlustes, dann sind Biomarker wünschenswert, die die zugrundeliegende Pathophysiologie der chronischen Transplantatverschlechterung wie Tubulusschädigung und tubulointerstitielle Fibrose widerspiegeln, um das Anwenden von invasiven Methoden wie eine Nierenbiopsie vermeiden zu können und trotz allem im klinischen Alltag einen Parameter zur Hand zu haben, der das Ausmaß und die Art der Gewebeschädigung frühzeitig definiert. So wiesen Ix et al. 2016 den prädiktiven Nutzen von tubulointerstitielle Fibrose – Markern im Urin von stabilen Nierentransplantierten zur Identifizierung von Patienten mit höherem Risiko für Transplantatverlust nach (Ix et al. 2016). Dazu wurde eine Subkohorte der FAVORIT-Trial verwendet. Dies ist eine multizentrische, doppelblinde, randomisierte, kontrollierte Studie zur Bestimmung, ob die Senkung des Homocysteinspiegels mit einer Vitamintherapie die Rate der kardiovaskulären Ereignisse bei stabilen Nierentransplantierten (> 4000 Patienten, mindestens sechs Monate nach Transplantation) reduziert (medianes Follow-Up 3,5 Jahre). Als sekundäre Endpunkte wurden Patienten- und Transplantatüberleben betrachtet (Bostom et al. 2006, 2009; Foster et al. 2017). Ebenfalls anhand dieser Kohorte bestätigten Bostom et al. 2018, dass niedriges Serum-Uromodulin, ein exklusiver Marker der Tubulusschädigung aus dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und dem gewundenen Teil des distalen Tubulus, in 613 stabilen Nierentransplantierten mit einem nicht-adjustierten, dreifach erhöhten Risiko für Transplantatverlust einhergeht (Bostom et al. 2018). Nauta et al. testeten 2011 vier Tubulusschaden-Marker, H-FABP (*heart fatty acid binding protein*), KIM-1 (*kidney injury molecule 1*), NAG (*N-acetyl-β-D-glucosaminidase*) und NGAL (*Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin*) im Urin von 606 mindestens ein Jahr lang Nierentransplantierten, die alle für sich Transplantatverlust in einem medianen Follow-Up von 4,7 (25.-75. Perzentile: 3,8 - 5,2) Jahren vorhersagen können. Nichtsdestotrotz zeigten diese Biomarker keine Überlegenheit gegenüber der in der Routinemessung bereits etablierten Albuminurie, sodass weitere Studien zur Evaluation von Biomarkern als Prädiktoren für Transplantatverlust benötigt werden (Nauta et al. 2011).

1.6 PATIENTENÜBERLEBEN NACH NIERENTRANSPLANTATION

Die Transplantation gilt aufgrund der zahlreichen Vorteile eines funktionierenden Transplantats im Vergleich zur Dialyse als die optimale Form der Nierenersatztherapie. Dazu gehören neben der Verbesserung der Lebensqualität vor allem die Erhöhung des Patientenüberlebens (Devine et al. 2018). Pippias et al. fassten 2017 den jährlichen Report aus dem *European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association* (ERA – EDTA)-Register zusammen: So zeigten Patienten, die von 2005 - 2009 mit Dialyse begonnen haben, ein Fünf-Jahres-Überleben von 63,3 % [95 % KI, 63,0 – 63,6], wohingegen Patienten, die von 2005 - 2009 nierentransplantiert wurden, eine Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 95,7 % [95 % KI, 95,2 – 96,2] nach Lebendspende und 92,3 % [95 % KI, 91,9 – 92,7] nach Kadaverspende

besaßen (Pippias et al. 2017). Jedoch weisen Nierentransplantierte nicht dieselbe Lebenserwartung wie ihre Alters-entsprechende Vergleichsgruppe der Nierengesunden auf. Während ein gesunder 20-Jähriger in Europa mit weiteren 62 Jahren Lebenszeit rechnen kann, kann derselbe erfolgreich Nierentransplantierte 44 Jahre und ein chronisch Dialysepflichtiger nur 22 Jahre erwarten (Pippias et al. 2017). Diese Diskrepanz in der Lebenserwartung ist zum größten Teil auf die erhöhte Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei terminaler Niereninsuffizienz zurückzuführen. Das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen unter chronischer Hämodialyse wird auf das 10 - 20-Fache des Risikos der Allgemeinbevölkerung geschätzt (Devine et al. 2018). Obwohl eine erfolgreiche Transplantation dieses Risiko deutlich reduzieren kann, haben Nierentransplantierte immer noch eine jährliche kardiovaskuläre Ereignisrate von 3,5 - 5 %, was 50 % höher ist als in der Allgemeinbevölkerung. Zusammengefasst sind die kardiovaskulären Ereignisse die häufigste Todesursache nach Nierentransplantation und Tod mit funktionierendem Transplantat stellt gleichzeitig den häufigsten Grund für Transplantatverlust dar (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Dieses Problem hat sich im letzten Jahrzehnt mit der Zunahme des Alters der zu Transplantierenden verschärft. Neben dem Alter des Empfängers spielen die systemischen Begleiterkrankung eine entscheidende Rolle für das Patientenüberleben nach Transplantation: So erhöhen Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Adipositas, Nikotinabusus und Hyperlipidämie das Risiko für tödliche und nicht-tödliche kardiovaskuläre Ereignisse, wie z.B. Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und Schlaganfall (Wu et al. 2005). Auch die Zeit der Dialyseabhängigkeit vor Transplantation und generell die chronische Niereninsuffizienz beeinflusst maßgeblich das erhöhte kardiovaskuläre Risiko für die Patienten. Im Rahmen einer Post-hoc-Analyse der o.g. FAVORIT-Studie zeigten Weiner et al. 2012, dass das Funktionsniveau und der Funktionsverlust der Transplantatniere einen direkten unabhängigen negativen Einfluss auf kardiovaskuläre Ereignisse und Tod haben (Weiner et al. 2012).

Darüber hinaus konnten auch nicht-traditionelle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und Tod gefunden werden. Eine Studie von Kasiske et al. 2000 zeigte, dass zwei oder mehr Episoden einer akuten Abstoßung im ersten Jahr das Risiko einer ischämischen Herzerkrankung um 62 % erhöhen (Kasiske et al. 2000). Außerdem tragen Immunsuppressiva, wie Steroide und Calcineurininhibitoren, wesentlich zum erhöhten Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei. Dies geschieht vor allem durch die Verstärkung traditioneller Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie (Devine et al. 2018). Doch beeinflussen sie ebenfalls maßgeblich das Infektions- und Malignomaufreten, welche die zweit- und dritthäufigsten Todesursachen nach Nierentransplantation darstellen (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Vella 2018).

Um diese Ereignisse zu verhindern, gilt es erfolgreich Prävention zu betreiben und die Risiken zu minimieren. Mehrere große Studien haben versucht, Risikovorhersagemodelle speziell für den Einsatz in der Nierentransplantation zu entwickeln: Im Jahr 2012 entwickelten Soveri et al. einen kardiovaskulären Risikorechner für Nierentransplantierte (CRCRTR-MACE), der eine Risikoschätzung über einen Zeitraum von sieben Jahren liefert. Dieser Rechner berücksichtigt sieben Variablen, darunter Alter, frühere ischämische Herzerkrankung, Diabetes, LDL-Cholesterin, Serumkreatinin, Anzahl der vorherigen Transplantationen und Raucherstatus (Soveri et al. 2012, 2013). Molnar et al. veröffentlichten 2017 den *Transplant-Score*, der u.a. für die Vorhersage der Mortalität zehn Prädiktoren verwendet: Alter und Herkunft des Empfängers, Art und Dauer der Dialysepflichtigkeit, Albuminwert, ausgewählte Komorbiditäten wie koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes, zerebrovaskuläre Erkrankungen, und Art der Versicherung. Dieses Modell zeigt eine Diskriminierung der Fünf-Jahres-Mortalität von 0,70 (Konkordanzindex C zur Beurteilung der Modellgüte; [95 % KI, 0,67 - 0,73]) (Molnar et al. 2017).

Da allerdings auch für diese Modelle Limitierungen bewiesen wurden, wurden Versuche unternommen, ihre Qualität mittels Hinzufügen von Biomarkern zu verbessern. Weit verbreitete kardiovaskuläre Biomarker sind z.B. Troponin T (TnT) und N-terminale natriuretische Peptide vom B-Typ (NT-proBNP), deren Konzentrationen stark mit der eGFR korrelieren und daher schwierig zu interpretieren sind (Devine et al. 2018). Nichtsdestotrotz konnten Conolly et al. 2008 einen unabhängigen prädiktiven Nutzen für Mortalität von Troponin T in Nierentransplantierten nachweisen (Connolly et al. 2008). Darüber hinaus konnte eine große Studie mit über 2000 stabilen Nierentransplantierten von Abedini et al. 2009 einen ähnlichen Nutzen für C-reaktives Protein (CRP) zeigen (Abedini et al. 2009). Aber auch der Anstieg von Biomarkern der Nierenschädigung, wie das Neutrophile Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL), im Urin von stabilen Nierentransplantierten ist in der o.g. FAVORIT-Studienkohorte mit einem 24 % größeren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und einem 44 % höheren Risiko für Mortalität assoziiert (adjustierte Hazard Ratio (aHR); 1,24; [95 % KI; 1,06 – 1,45]; aHR, 1,44; [95 % KI, 1,26 – 1,65]) (Bansal et al. 2016). Es bedarf weiterer Arbeiten, um potentielle Biomarker zu identifizieren und ihren Nutzen für den klinischen Alltag z.B. im Einsatz von Risikorechnern zur Optimierung des Patientenüberlebens nach Transplantation zu evaluieren (Devine et al. 2018).

1.7 NEUTROPHILE GELATINASE-ASSOZIIERTES LIPOCALIN

NGAL ist ein Protein aus der Lipocalin-Superfamilie. Lipocaline bestehen aus acht beta-Faltblättern, die ein beta-Fass formen und kleine Moleküle binden, um sie zu transportieren (Flower et al. 2000). Ursprünglich wurde NGAL in neutrophilen Granulozyten identifiziert: Hier wirkt es im Rahmen der Immunabwehr bakteriostatisch, indem es durch den Transport

von Siderophoren (eisenbindende Moleküle der Bakterien), den Bakterien das Eisen entzieht (Goetz et al. 2002). Allerdings kommt NGAL auch in anderen Zelltypen vor: So wird es zum Beispiel in der Niere, der Lunge, der Leber und generell in Epithelzellen als Reaktion auf verschiedene pathologische Ereignisse gebildet, z.B. Inflammation, Infektion, neoplastische Transformation und Ischämie (Cowland & Borregaard 1997; Goetz et al. 2000; Kjeldsen et al. 2000; Mishra et al. 2003, 2005; Nielsen et al. 1996; Xu et al. 1995). Außerdem spielt NGAL eine Rolle bei Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen, darunter auch Nierenepithelzellen (Singer 2013).

Es gibt mehrere NGAL-Formen: die monomere 25 kDa und homodimere 45 kDa sowie 135 kDa heterodimere Form (Kjeldsen et al. 1993). Die NGAL-Monomere werden vorwiegend in den Tubulusepithelzellen der Niere produziert, während die homodimere Form vorwiegend aus den Neutrophilen stammt (Cai et al. 2010). Kommt es zu einer akuten Nierenschädigung durch z.B. oxidativen Stress wird NGAL vor allem im distalen Teil des Nephrons (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, Sammelrohr (siehe Abbildung 1)) massiv hochreguliert und exprimiert, so dass erhöhte NGAL-Spiegel im Plasma und Urin nachweisbar sind (Mori et al. 2005; Schmidt-Ott 2011; Schmidt-Ott et al. 2007). NGAL wird im Glomerulum gefiltert und im proximalen Tubulus luminal reabsorbiert (Hvidberg et al. 2005; Mori et al. 2005). Ist der proximale Tubulus durch akute Schädigung im Rahmen einer Tubulusnekrose beeinträchtigt, fehlt die Reabsorption von NGAL, was wiederum zu einer Erhöhung der anfallenden NGAL-Konzentration führt. Die NGAL-Erhöhung ist frühestens drei Stunden nach Nierenschädigung nachweisbar und erfährt seinen Peak ca. 6-12 Stunden nach der Schädigung je nach Schweregrad. Dies kann bis zu fünf Tage nach Schädigung nachweisbar bleiben (Mishra et al. 2005; Parikh et al. 2011).

Diese Charakteristika können dazu führen, dass NGAL gegenüber Kreatinin, welches hingegen nur ein Marker der Funktionsverschlechterung darstellt, in der Diagnose einer akuten Nierenschädigung überlegen verwendet werden könnte (Singer et al. 2013).

1.7.1 NGAL IN KLINISCHEN STUDIEN

NGAL ist der am besten untersuchteste Biomarker für die frühe Vorhersage von akuter Nierenschädigung (Haase et al. 2009; Schrezenmeier et al. 2017; Singer et al. 2013; Zhou et al. 2016). Es wurden Studien zum akuten Nierenversagen in verschiedenen klinischen Settings durchgeführt: Nach herzchirurgischer Operation bei Kindern (Bennett et al. 2008; Dent et al. 2007) und Erwachsenen (Haase et al. 2009; Koyner et al. 2012; Parikh et al. 2011; Perry et al. 2010; Wagener et al. 2006), Kontrastmittel-induziertes Nierenversagen (Tong et al. 2015), Sepsis-assoziiertes Nierenversagen (Zhang et al. 2016) und generell akutes Nierenversagen bei kritisch Kranken auf der Intensivstation (de Geus et al. 2011; Matsa et al. 2014) oder bei Nierengesunden in der Notaufnahme (Nickolas et al. 2008, 2012, Singer et al. 2011, 2013) sowie nach

Nierentransplantation (Hollmen et al. 2011; Mishra et al. 2006; Parikh et al. 2006; Ramirez-Sandoval et al. 2015). Haase-Fielitz et al. fassten 2014 in ihrem Review zusammen, dass nach einer Herzoperation die NGAL-Messung bei über 7000 Patienten prädiktiv für die Nierenschädigung und ihre Schwere mit einer AUC von 0,82 - 0,83 war. Ähnliche Ergebnisse wurden bei über 8500 kritisch kranken Patienten erzielt. Bei über 1000 Patienten, die sich einer Nierentransplantation unterzogen, prognostizierten NGAL-Messungen zum Zeitpunkt der Transplantation eine verzögerte Transplantatfunktion mit einer Gesamt-AUC von 0,87. In allen drei Settings verbesserte NGAL die Vorhersage des Risikos für akute Nierenschädigung signifikant gegenüber dem klinischen Modell allein (Haase-Fielitz et al. 2014).

In den o.g. Studien stellte teils Plasma-NGAL (pNGAL) und teils Urin-NGAL (uNGAL) den signifikanteren Prädiktor dar oder es gab kaum einen Unterschied zwischen der diagnostischen Güte beider Parameter. Jedoch gaben Schmidt-Ott et al. 2011 zu bedenken, dass es bei Harnwegsinfekten zu unspezifisch erhöhten NGAL-Werten im Urin kommt, sodass pNGAL bei Patienten mit hohem Harnwegsinfektrisiko als geeigneterer Parameter erscheint (Schmidt-Ott 2011).

Singer et al. zeigten 2011, dass anhand der Höhe der uNGAL-Konzentration eine Klassifizierung und Stratifizierung von Patienten mit etablierter Nierenschädigung vorgenommen werden kann. Darüber hinaus waren hohe uNGAL-Spiegel mit schlechten klinischen Outcomes assoziiert (Singer et al. 2011). Mehrere andere Studien zeigten, dass NGAL in der Vorhersage von Nierenfunktionsverlust bis hin zur Notwendigkeit von Nierenersatztherapie und Mortalität nützlich sein könnte (Hall et al. 2011; Nickolas et al. 2008, 2012; Schrezenmeier et al. 2017; Singer et al. 2016). Die meisten Studien in der Nierentransplantation zielen auf die Prädiktion von Kurzzeitoutcomes in den ersten Tagen, Wochen, nur wenige auf Langzeitoutcomes drei bis zwölf Monate oder gar drei, fünf oder mehr Jahre nach Transplantation ab: So gibt es viele Studien mit Nierentransplantierten, die sich mit NGAL und der Prognose von DGF beschäftigen. In einem 2018 veröffentlichten Review von Cappuccilli et al. wird zusammengefasst, dass uNGAL sechs Stunden postoperativ gemessen die beste prognostische Genauigkeit zur Vorhersage von DGF bietet und dass pNGAL zwölf Stunden postoperativ der zuverlässigste Prädiktor für AKI und Transplantatabstoßung sei (Sensitivität: 100 %; Spezifität: 92 %; Cut-off-Wert: 309 ng/ml) (Cappuccilli et al. 2018). Dabei erwies sich die Nützlichkeit von pNGAL außerdem als weitaus besser als die prognostische Genauigkeit des korrespondierenden Serumkreatinins (Sensitivität: 66,7 %; Spezifität: 61,9 %) (Pezeshgi et al. 2016). Außerdem kann pNGAL bis zu 96 h nach Transplantation gemessen einen Transplantatverlust in drei Monaten nach Transplantation mit angemessener Sensitivität und Spezifität vorhersagen (Jafari et al. 2017). Ebenso besteht ein Zusammenhang mit NGAL in den ersten postoperativen Tagen und der Transplantatfunktion nach einem Jahr (Choi et al. 2013; Fonseca et al. 2013). Betrachtet man die prädiktive Rolle von NGAL für Langzeitoutcomes, so haben mehrere Arbeiten in der Tat gezeigt, dass NGAL nicht nur einen

Biomarker für akute Nierenschäden darstellt, sondern auch eine diagnostische und prognostische Rolle bei der Progression chronischer Niereninsuffizienz besitzt (Bolignano et al. 2009; Lacquaniti et al. 2016). In Studien mit 84 Nierentransplantierten konnte durch Lacquaniti et al. 2016 in einem Fünf-Jahres-Follow-Up gezeigt werden, dass hohe Plasma- und Urin-NGAL-Spiegel bei Transplantation mit einem erhöhten Risiko für eine Progression der chronischen Transplantatnephropathie assoziiert sind (uNGAL HR 1,15 [95 % KI, 1,09 – 1,26] $p < 0,001$; pNGAL HR 1,08 [95 % KI, 1,03 – 1,10] $p = 0,02$) (Lacquaniti et al. 2016).

Im Gegensatz dazu konnten Mayer et al. 2018 keine signifikante Beziehung herstellen zwischen NGAL zwei Tage nach Transplantation in Urin und Plasma gemessen und Transplantatverlust oder Mortalität zwei und fünf Jahre nach Transplantation (Maier et al. 2018).

Ramirez-Sandoval et al. veröffentlichten 2014 eine Studie mit 67 stabilen Nierentransplantierten, bei denen erst zum Zeitpunkt eines späteren AKIs (durchschnittlich drei Jahre nach Transplantation) uNGAL gemessen wurde und damit ein Transplantatverlust innerhalb eines Jahres mit Sensitivität und Spezifität von 84 % und 91 % (AUC-ROC 0,89 [95% KI, 0,81 - 0,97]) bei einem Cut-Off-Wert von 210 ng/ml prognostiziert werden konnte (Ramírez-Sandoval et al. 2014).

Hingegen ist bis heute wenig über NGAL in der chronischen Phase nach Nierentransplantation bekannt. Eine Studie zeigte, dass bei Transplantierten mit stabiler Transplantatfunktion erhöhte uNGAL-Spiegel mit einer subklinischen Tubulitis assoziiert sind (Schaub et al. 2009). In einer Sub-Kohorte der bereits o.g. FAVORIT-Trial wurde durch Bansal et al. 2016 nachgewiesen, dass erhöhte NGAL-Level im Urin von über 1000 stabilen Nierentransplantierten mit einem um 40 % höheren Risiko für Transplantatverlust, mit einem 24 % größeren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und einem 44 % höheren Risiko für Mortalität (aHR, 1,40 [95% KI, 1,16 - 1,68] aHR, 1,24 [95 % KI, 1,06 - 1-45]; aHR, 1,44 [95 % KI, 1,26 - 1,65]) unabhängig assoziiert sind (Bansal et al. 2016). Wohingegen Nauta et al. 2011 in einer etwas kleineren monozentrischen Kohorte zwar ebenfalls einen prädiktiven Nutzen für uNGAL in Bezug auf Transplantatverlust nachweisen konnte, dieser allerdings im Vergleich zur Albuminurie nicht unabhängig war (Nauta et al. 2011).

1.8 CALPROTECTIN

Calprotectin ist ein 24 kDa schwerer Calcium-bindender Komplex bestehend aus den beiden Proteinen S100A8 und S100A9 (Stríz & Trebichavský 2004). Es befindet sich zu 60 % im Zytoplasma von Granulozyten. Es ist ein Mediatorprotein des angeborenen Immunsystems und wird aus den Monozyten und neutrophilen Granulozyten freigesetzt, um die Inflamationsreaktion über den *Toll-like-Rezeptor 4* zu verstärken (Seibert et al. 2017; Tepel et al. 2014). Da das angeborene Immunsystem ebenfalls eine entscheidende Rolle im Rahmen von akuter

Tubulusepithelschädigung in der Niere spielt, wandern neutrophile Granulozyten ein und setzen die Mediatorproteine S100A8 und S100A9 vermehrt frei, um die Immunantwort zu unterstützen (Anders 2010). Außerdem kann Calprotectin durch die renalen Sammelrohrzellen als Antwort auf Nierenschädigung produziert werden (Fujiu et al. 2011) (vergleiche Abbildung 1).

Calprotectin hat sich als diagnostischer Marker vor allem in der Gastroenterologie etabliert. Durch die stattfindende Leukozytenmigration stimulierter neutrophiler Granulozyten in die Darmmukosa ist es in hohen Mengen bei Erkrankungen wie die chronisch-entzündliche Darmerkrankung, aber auch Darminfektionen und Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes nachweisbar (Foell et al. 2009; Kristinsson et al. 1998). Die Messungen wurden vor allem im Stuhl in den klinischen Alltag etabliert, sind aber auch im Plasma und Urin möglich. Calprotectin im Urin (uCalprotectin) kann neben akuter Nierenschädigung ein Marker für Harnwegsinfektionen und Urothelkarzinome sein (Ebbing et al. 2014).

Darüber hinaus wurde eine Calprotectinerhöhung auch in einigen anderen Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis (Hammer et al. 2008) oder Myokardinfarkt (Altwegg et al. 2007) festgestellt. Nordal et al. wiesen 2017 für Calprotectin im Plasma (pCalprotectin) die stärkste Assoziation zur Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis nach (Nordal et al. 2017). Ebenso konnten Kunutsor et al. 2018 zeigen, dass pCalprotectin mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko korreliert (Kunutsor et al. 2018).

Ebbing et al. konnten 2016 experimentell zeigen, dass Calprotectin ca. zwei Stunden nach Ischämieschaden in der Niere ansteigt, sein Maximum ca. 48 h später erreicht und bis zu fünf Tage weiterhin signifikant erhöht nachweisbar ist (Ebbing et al. 2016).

1.8.1 CALPROTECTIN IN KLINISCHEN STUDIEN

Es gibt drei Studien, die gezeigt haben, dass es sich bei Calprotectin um einen vielversprechenden Marker in der Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens handelt (Frischmann 2015). Mit Hilfe der Calprotectinkonzentration im Urin ist eine Differenzierung zwischen einem prärenalen und einem intrarenalen Typ möglich (Chang et al. 2015; Heller et al. 2011; Seibert et al. 2013). uCalprotectin zeigte in diesen Studien eine sehr hohe Genauigkeit bei der Vorhersage des intrinsischen AKIs mit einer AUC im Bereich von 0,92 bis 0,97.

In der Nierentransplantation zeigten Tepel et al. 2014, dass uCalprotectin eine signifikante, aber schwache inverse Korrelation mit dem eGFR-Verlust vier Wochen, sechs und zwölf Monate nach Transplantation gemessen, aufweist (Tepel et al. 2014). In einer multizentrischen Studie analysierten Westhoff et al. 2016 die diagnostische Genauigkeit von Calprotectin bei der Differenzierung von prärenalem und intrinsischem akuten Nierentransplantatversagen (Westhoff et al. 2016). Insbesondere waren die Calprotectinkonzentrationen im Urin bei

Patienten mit intrinsischem akutem Nierentransplantatversagen 36-mal höher, was zu einer AUC von 0,94 führte (Seibert et al. 2017).

Im Gegensatz dazu konnten Seibert et al. 2018 in einer prospektiven Studie mit 143 stabilen chronisch Niereninsuffizienten und einem medianen Follow-Up von 37 Monaten keinen prognostischen Wert für uCalprotectin bezogen auf Nierenfunktionsverschlechterung feststellen (Seibert et al. 2018).

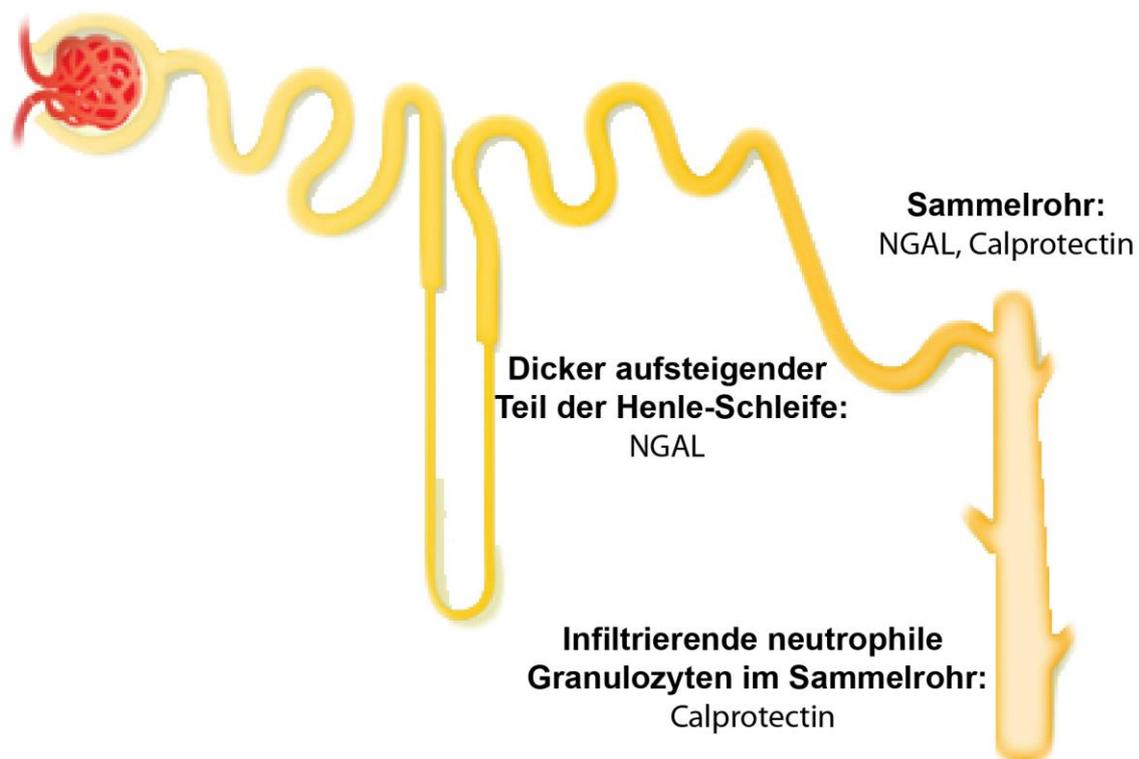


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildungsorte von NGAL und Calprotectin im Nephron bei akuter Tubulusschämie. Modifiziert nach (Schrezenmeier et al. 2017).

1.9 ZIELSTELLUNG

Die vorliegende Promotion beschäftigt sich mit dem prognostischen Nutzen der Biomarker für intrinsische Nierenschädigung Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin und Calprotectin gemessen im Urin und Plasma von Nierentransplantierten zu einem stabilen Zeitpunkt im Rahmen der chronischen Transplantatnachsorge. Es soll evaluiert werden, ob NGAL und Calprotectin als punktuelle Messwerte schlechte Langzeitergebnisse vorhersagen können. Betrachtet werden hierbei das Tod-zensurierte Langzeittransplantatüberleben sowie das ganzheitliche Langzeitpatientenüberleben und ein gemeinsamer Endpunkt aus Transplantatverlust und Tod. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob Cut-Off-Werte gefunden und ein Biomarker-assistiertes Vorhersagemodell für die Risikostratifizierung in der klinischen Praxis entwickelt werden können, um die bisher etablierte Entscheidungsfindung basierend auf herkömmlichen Nierenfunktionsparametern und konsekutiv die Langzeitergebnisse in der Nierentransplantation zu verbessern. Zu diesem Zweck führten wir eine monozentrische prospektive Beobachtungsstudie an Nierentransplantierten im Rahmen der Routinenachsorge durch.

2 METHODEN

2.1 STUDIENDESIGN

Wir führten in der Nierentransplantationsambulanz der Charité-Universitätsmedizin Campus Berlin - Mitte eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie (VS-NTX-Studie) zur Beurteilung der prognostischen Wertigkeit von Biomarkern wie NGAL und Calprotectin in Blut und Urin bei stabilen Nierentransplantierten durch. Das Protokoll der Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission geprüft und genehmigt. Dafür wurden vom 10.4.2013 bis 10.09.2013 insgesamt 798 Nierentransplantierte als potentielle Studienteilnehmer identifiziert. Es wurden die Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 2) angewendet: Sie mussten mindestens 18 Jahre alt, einwilligungsfähig und wenigstens zwei Monate lang nierentransplantiert sein. Außerdem durfte es innerhalb der letzten fünf Jahre zu keiner Diagnose und/oder Therapie einer malignen Erkrankung (mit Ausnahme von Basaliomen) gekommen sein; es musste eine stabile Transplantatfunktion vorliegen, was ab einem Serumkreatinin-Anstieg um mindestens 0,3 mg/dl im Vergleich zu den letzten drei Vorwerten der ambulanten Vorstellungen nicht mehr der Fall war; die eGFR durfte nicht < 15 ml/min sein und eine klinische Instabilität, definiert durch das klinische und/oder laborchemische Vorliegen einer Infektion oder einer akuten Indikation zur stationären Krankenhausaufnahme, musste ausgeschlossen sein. Von den 709 schriftlich eingewilligten und eingeschlossenen Studienpatienten wurden bei Routineterminen in der Ambulanz alle drei Monate (\pm 1,5 Monate) bis zu einem Jahr (Monat 0, 3, 6, 9, 12) Blut- sowie Urinproben für die Biomarkerbestimmungen gesammelt. Übliche Routinelaborparameter (u.a. Kreatinin, Proteinurie) wurden standardmäßig durch das lokale Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH bestimmt. Kam es zu ungeplanten Hospitalisierungen in der Charité (Campus Mitte), wurden erneut je eine Blut- und Urinprobe innerhalb von 48 h nach Krankenhausaufnahme abgenommen. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich die Biomarkerbestimmungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (Monat 0 = t₀) betrachtet.

Die Studienproben, je 10 ml EDTA-Blut und 10 ml Spontanurin, wurden für 10 min bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand wurde in max. drei Aliquots zu 0,5 ml abpipettiert und in pseudonymisierter Form innerhalb von 6 h nach Abnahme bei -80°C eingefroren.

Klinische Daten wurden aus den Patientenakten und elektronischen Datenbanken der Klinik erhoben.

Die Patienten wurden bis zum 1.4.2018 bezüglich folgender Endpunkte nachbeobachtet: 1. kombinierter Endpunkt aus Tod und Transplantatverlust, 2. Tod und 3. Tod-zensurierter Transplantatverlust. Hierbei war ein Transplantatverlust definiert durch die Notwendigkeit einer nicht-vorübergehenden Initiierung einer Nierenersatztherapie. Als Follow-Up-Zeit definierten wir die Zeit vom Tag des Einschlusses in die Studie bis zum Tag des Transplantatverlustes, des Todes oder des Studienendes.

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der VS-NTX-Studie.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter \geq 18 Jahre	Nicht einwilligungsfähig
Nierentransplantation vor mind. zwei Monaten	Malignomerkkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre
Schriftliches Einverständnis	eGFR $<$ 15 ml/min
	Instabile Nierenfunktion (= Kreatininanstieg \geq 0,3 mg/dl im Vergleich zu Vorwerten)
	Klinisch instabil (= Infektgeschehen und/oder akute Aufnahmeindikation)

2.1.1 NGAL-BESTIMMUNG

Zur Bestimmung der NGAL-Konzentration in den Plasma- und Urin-Proben wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Testverfahren (THE NGAL TEST™, BioPorto® Diagnostics, Hellerup, Dänemark) auf einer klinischen Plattform (cobas®6000, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) angewandt (Hansen et al. 2014). Alle Messungen erfolgten nach Beendigung der Probensammlung im Labor Berg (Oudenarder Str. 16, 13347 Berlin – Wedding). Bei dem Test handelt es sich um einen partikelverstärkten turbidimetrischen Immunoassay. Dabei verbinden sich die NGAL-Moleküle in der Probe mit Latexmikropartikeln, welche mit monoklonalen murinen Anti-NGAL-Antikörpern beschichtet sind. Die entstehenden Präzipitate streuen Licht bei 700 nm. Die NGAL-Konzentration wird nach dem Prinzip der photometrischen Absorption anhand einer Eichkurve bestimmt. Die quantitative Bestimmung von NGAL erfolgte in einem Messbereich von 25 ng/ml bis 5000 ng/ml. Für diesen Test liegen die erwarteten mittleren Messwerte bei gesunden Menschen im EDTA-Plasma bei 63 ng/ml und im Urin bei 5,3 ng/ml (BioPorto Diagnostics A/S, Tuborg Havnevej 15 2016).

2.1.2 CALPROTECTIN-BESTIMMUNG

Zur Bestimmung der Calprotectin-Konzentration in den Plasma- und Urin-Proben wurde das IDK® Calprotectin ELISA Kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) angewandt. Alle Messungen erfolgten nach Beendigung der Probensammlung durch unsere Kooperationspartner (Frau Simone Voigt, Medizinisch-technisch Angestellte; Arbeitsgruppe

Prof. Timm Westhoff, Klinik für Nephrologie am Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Dabei werden zwei ausgewählte monoklonale Antikörper, die humanes Calprotectin erkennen, verwendet. Durch das Peroxidase-Konjugat des Antikörper-Calprotectin-Antikörper-Komplexes wird der Farbumschlag eines hinzugegebenen Chromogens, das Tetramethylbenzidin (TMB), katalysiert. Die Intensität der entstandenen Farbe wird photometrisch bestimmt (Absorption bei 450 nm) und ist direkt proportional zu der Calprotectinkonzentration. Der mediane Wert von Calprotectin im Urin ist für diesen Test bei Erwachsenen ca. 51 ng/ml; Referenzwerte im Blut sind nicht bekannt (Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim 2019).

2.1.3 KREATININ- UND PROTEINURIE-BESTIMMUNG

Die Nierenfunktionsparameter Serumkreatinin (sKrea) und Proteinurie wurden im Rahmen der Routinediagnostik durch das Labor Berlin bestimmt. Kreatinin wurde nach der Jaffé-Methode standardmäßig gemessen. Proteinurie wurde mittels Urinteststreifen semiquantitativ ermittelt: Erst ab einem Ergebnis von „+“ entsprechend 0,3 g/l wurde die Proteinurie als positiv gewertet.

2.2 STATISTISCHE ANALYSEN

Für die statistischen Analysen wurden IBM SPSS Statistics 25, Stata (Version IC 15.1) und R (Version 3.5.1.) verwendet. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$ bzw. wir verwarfen die Nullhypothese bei $p < 0,05$.

Wir beschrieben die Studienpopulation mit kontinuierlichen Variablen, die mittels Mann-Whitney-U-Test, und mit kategorialen Variablen, die mittels χ^2 -Quadrat-Test verglichen wurden. Die Werte wurden als Mittelwert (\pm Standardabweichung = SD) oder Median [Interquartilsabstand = IQA] dargestellt.

Zur Visualisierung der Verteilung der Plasma-NGAL-, Plasma-Calprotectin und Serumkreatinin-Konzentrationen abhängig von den betrachteten Endpunkten erstellten wir Box Plots mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die deskriptive Statistik wurde in IBM SPSS Statistics 25 ausgeführt.

Mit Hilfe der Programmiersprache R erstellten wir *Time-dependent Receiver Operating Characteristics (timeROC)* zur Ermittlung der prognostischen Aussagekraft der Biomarker pNGAL, pCalpro und sKrea im Hinblick auf unsere Endpunkte kombiniert aus Tod oder Transplantatverlust, Transplantatverlust und Tod nach drei, vier und fünf Jahren (Heagerty et al. 2000). Zur Bestimmung ihrer Zuverlässigkeit gaben wir die AUC an: Sie liegt zwischen 0,5 und 1,0, wobei 0,5 keinen aussagekräftigen Gewinn und 1,0 eine absolute Testzuverlässigkeit

bedeutet. Von der *timeROC*-Kurve für Transplantatverlust nach fünf Jahren wurden die Werte für Sensitivität und Spezifität von pNGAL und sKrea abgelesen und mittels Vergleiche der höchsten Youden-Indizes (Sensitivität + Spezifität - 1) jeweils ein Cut-Off-Wert ermittelt (Youden 1950). Für den Cut-Off-Wert von pNGAL und sKrea wurde in Bezug auf alle drei Endpunkte und alle drei Zeitpunkte die Sensitivität und Spezifität, der positive und negative Vorhersagewert sowie die positive und negative Likelihood Ratio errechnet. Darüber hinaus wurden uni- und multivariate Cox -Regressionen in Stata Version IC 15.1 durchgeführt, um den prädiktiven Nutzen von Biomarkern (pNGAL, uNGAL, pCalpro, uCalpro), Laborparametern (u.a. sKrea, Proteinurie) sowie von demographischen Variablen, Transplantationsdaten und Nebenerkrankungen bezogen auf die Endpunkte festzustellen. Von univariat signifikanten und klinisch interessanten Parametern wurden Biomarker-basierte Vorhersagemodelle für den kombinierten Endpunkt aus Tod und Transplantatverlust, Transplantatverlust (Tod-zensuriert) und Tod abgeleitet und das Risiko für das Auftreten der Endpunkte im Vergleich zu Nichtbetroffenen mittels HR angegeben. Für das Prädiktionsmodell von Transplantatverlust wurde zudem eine *Competing Risk*- Analyse mit Tod als konkurrierendes Ereignis durchgeführt und mit dem herkömmlichen Cox- Regressionsmodell verglichen (Noordzij et al. 2013). pNGAL wurde in den Cox- Regressionsanalysen pro 100 ng/ml Anstieg evaluiert, indem die Prädiktorvariable pNGAL vor der Analyse durch 100 geteilt wurde.

Es wurden Überlebenszeitanalysen abhängig von dem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren und für den Endpunkt Transplantatverlust außerdem abhängig des Transplantatalters durchgeführt. Das kumulative Risiko wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven für verschiedene Risikogruppen (pNGAL \geq oder $<$ Cut-Off-Wert; sKrea \geq oder $<$ Cut-Off-Wert; pNGAL und sKrea $<$ Cut-Off-Wert oder pNGAL $<$ und sKrea \geq Cut-Off-Wert oder pNGAL \geq und sKrea $<$ Cut-Off-Wert oder pNGAL und sKrea \geq Cut-Off-Wert) visualisiert. Mit Hilfe des Log-Rank- Tests wurden die Überlebenszeiten von zwei Gruppen miteinander verglichen.

Fehlende Daten wurden durch mehrfache Imputation mittels Kettengleichung (*Multiple Imputation by Chained Equation* = MICE) in Stata IC 15.1 vervollständigt. Unsere fehlenden Werte betragen 1-2 % für Spendertyp und Proteinurie, 4 % für DGF sowie positiven donorspezifische Antikörper (DSA)-Status und 7 % für Spender mit erweiterten Kriterien (*Expanded Criteria Donors* (ECD) = hirntote Spender \geq 60 Jahre alt oder zwischen 50 und 59 Jahre alt mit mindestens zwei der folgenden Kriterien: Vorgeschichte mit arterieller Hypertonie, letztes Serumkreatinin $>$ 1,5 mg/dl oder zerebrovaskuläre Todesursache (Merion et al. 2005)). In dem Imputationsmodell waren alle demographischen Variablen, Transplantationsverlust, Tod und Baseline-Nelson-Aalen-Schätzungen für beide Endpunkte enthalten. Es wurden zehn Datensätze generiert und die Ergebnisse nach Rubins Regel zusammengefasst (Rubin 1987).

3 ERGEBNISSE

3.1 FALLZAHL

Für die vorliegende monozentrische, prospektive Beobachtungsstudie (VS-NTX-Studie) kamen alle mindestens 18-jährigen, einwilligungsfähigen und vor \geq zwei Monaten nierentransplantierten Patienten in Frage, die regelmäßig die Nierentransplantationsambulanz der Charité-Universitätsmedizin Campus Berlin – Mitte zur Nachsorge besuchen. Von den 798 potentiellen Studienpatienten lehnten 21 die Studienteilnahme ab. 65 erfüllten die Einschlusskriterien nicht. Bei 22 lag innerhalb der letzten fünf Jahre eine maligne Erkrankung vor; elf hatten zum Zeitpunkt des geplanten Studieneinschlusses keine stabile Transplantatfunktion. Acht Patienten hatten eine eGFR < 15 ml/min. 24 Patienten waren zum Zeitpunkt des geplanten Studieneinschlusses klinisch instabil (Infektionserkrankung und/oder Indikation für eine nicht-elektive Krankenhausaufnahme). 712 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Von diesen lag bei drei Patienten am Tag des Studieneinschlusses keine vollständige Dokumentation der Kreatinin- oder Biomarkerbestimmungen vor, sodass sie von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Folglich wurden alle Analysen an insgesamt 709 Patienten durchgeführt. Das Flussdiagramm in Abbildung 2 zeigt schematisch die Bildung der Studienkohorte.

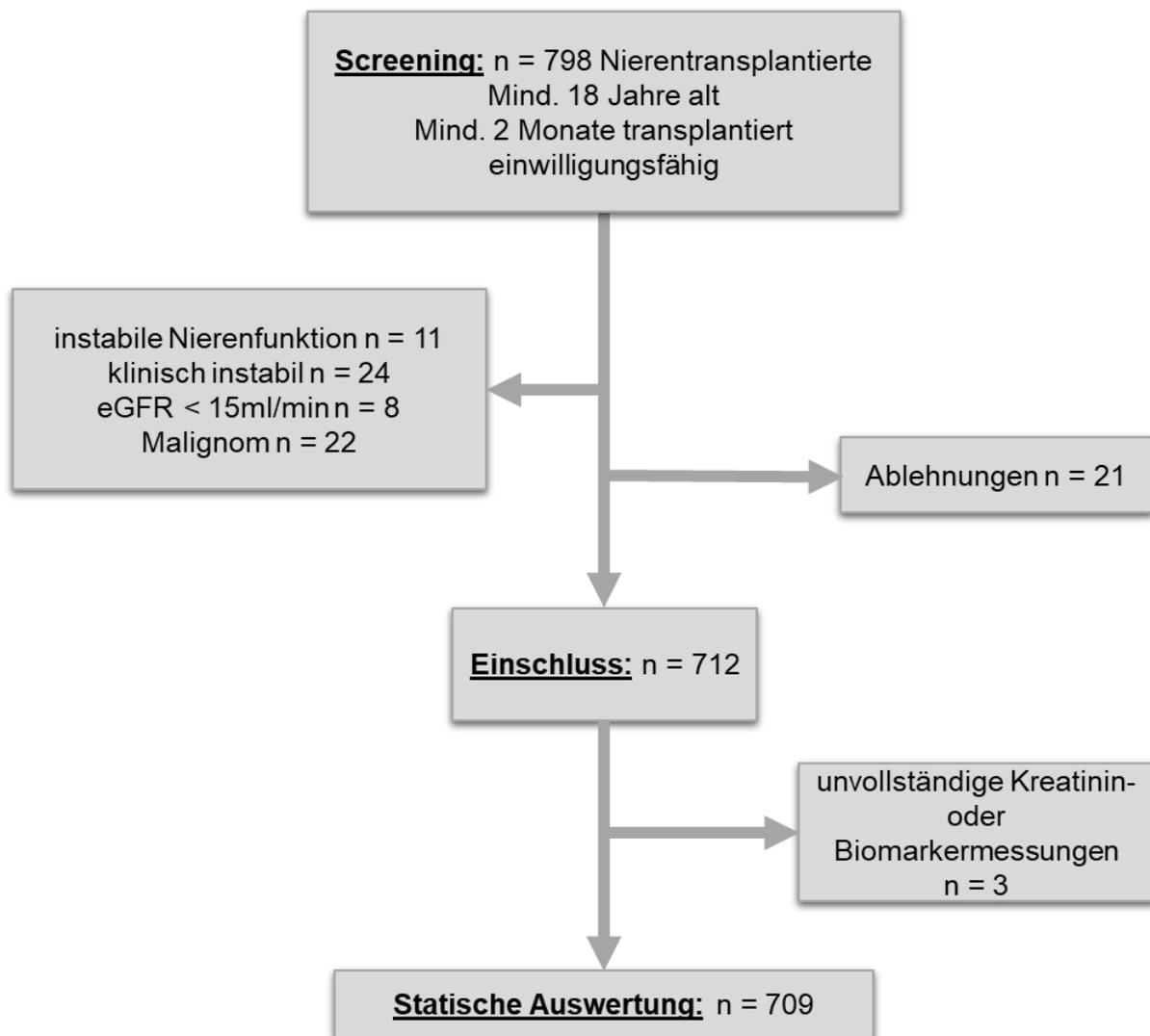


Abbildung 2: Flussdiagramm zur Bildung der Studienkohorte in der VS-NTX-Studie.

3.2 PATIENTENCHARAKTERISTIKA

Die 709 betrachteten Patienten waren im Mittel 54 Jahre ($SD \pm 14,35$) alt und wurden im Median 5,4 Jahre [IQA 2,23 - 10,13] nach Transplantation eingeschlossen. Sie wurden im Median 58 Monate [IQA 57 - 59] nachverfolgt. 118 (16,6 %) Patienten entwickelten während dieses Follow-Ups den kombinierten Endpunkt aus Tod und Transplantatverlust, wovon 84 (11,8 %) Patienten verstarben und 49 (6,9 %) einen Tod-zensierten Transplantatverlust erlitten. Zu 98,9 % betrachteten wir Patienten kaukasischer Herkunft. Es wurden mehr Männer (ca. 60 %) als Frauen (ca. 40 %) eingeschlossen. Etwa ein Drittel Lebendspenden, ein Drittel ECD und ein Drittel Organe mit DGF wurden einbezogen. Die nephrologischen Grunderkrankungen waren vielfältig. Die Komorbiditäten variierten von 97,5 % detektierter arterieller Hypertonie, zu

41,9 % Diagnosen von Herzinsuffizienz und zu 22,6 % von Diabetes mellitus. Das mediane sKrea bei Einschluss maß 1,53 mg/dl [IQA 1,22 - 1,92]. Das mediane pNGAL betrug 189 ng/ml [IQA 130 - 257], uNGAL 29 ng/ml [IQA 12 - 57,75]; das mediane pCalpro 539,5 ng/ml [IQA 335,4 - 913,8] und uCalpro 57,6 ng/ml [IQA 13,1 - 301,6]. 22,4 % der Studienpatienten hatten einen positiven Proteinurienachweis ≥ 30 mg/dl und 7,2 % wiesen DSA zum Zeitpunkt der Studienprobenabnahmen auf.

In allen drei Endpunkt-Kohorten (Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust und kombinierter Endpunkt) waren signifikant ältere Patienten, wohingegen sich das Transplantatalter zu den Kohorten ohne Endpunkt nicht signifikant unterschied. Außerdem stellten sich Unterschiede in den Transplantationsdaten, den Begleiterkrankungen und den Laborparametern dar. Die Biomarker pNGAL, pCalpro und sKrea zeigten im Plasma der kombinierter Endpunkt- sowie der Transplantatverlust-Kohorte signifikant höhere Werte, wohingegen in der Tod-Kohorte nur das pNGAL signifikant erhöht war. Im Urin konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem uNGAL und dem kombinierten Endpunkt sowie Transplantatverlust hergestellt werden; uCalpro erwies sich bei Patienten mit kombiniertem Endpunkt und Tod als erhöht. Die genauen Werte können der Patientencharakteristika-Tabelle (siehe Tabelle 3) entnommen werden. Der Unterschied der Biomarker NGAL, Calprotectin und Kreatinin in den Endpunkt- und Kein-Endpunkt-Kohorten ist zum besseren Vergleich nur im Plasma mithilfe von Box Plots visualisiert (siehe Abbildung 3).

***Tabelle 3: Patientencharakteristika bei Einschluss und nach Endpunkten.** SD = Standardabweichung, IQA = Interquartilsabstand. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, zwischen Patientengruppen mit und ohne Endpunkt berechnet mit Mann-Whitney-U-Test bzw. χ^2 -Quadrat-Test. ECD = Spender mit erweiterten Kriterien (Expanded Criteria Donors = hirntote Spender ≥ 60 Jahre alt oder zwischen 50 und 59 Jahre alt mit mindestens zwei der folgenden Kriterien: Vorgeschichte mit arterieller Hypertonie, letztes Serumkreatinin $> 1,5$ mg/dl oder zerebrovaskuläre Todesursache); DGF = verzögerte Transplantatfunktion (Delayed Graft Function = Notwendigkeit mindestens einer postoperativen Dialyse in den ersten sieben Tagen nach der Transplantation).*

Patientencharakteristika	Alle Patienten	Kombinierter Endpunkt (Tod oder Transplantatverlust)	Endpunkt Tod	Endpunkt Transplantatverlust
Anzahl, n (%)	709	118 (16,6 %)	84 (11,8 %)	49 (6,9 %)
Demographische Daten				
mittleres Alter, Jahre (SD)	54,04 (± 14,35)	63,04 (± 11,94)**	65,02 (± 10,77)**	60,63 (± 13,12)*
Ethnische Gruppe				
Kaukasisch, n (%)	701 (98,9 %)	116 (98,3 %)	82 (97,62 %)	48 (98 %)
Andere (Asiatisch, Afroamerikanisch, Hispanisch), n (%)	8 (1,1 %)	2 (1,7 %)	2 (2,38 %)	1 (2 %)
Geschlecht				
Frauen, n (%)	285 (40,2 %)	50 (42,4 %)	40 (47,62 %)	17 (34,7 %)
Männer, n (%)	424 (59,8 %)	68 (57,6 %)	44 (52,38 %)	32 (65,3 %)
Transplantationsdaten				
medianes Transplantatalter, Jahre [IQA]	5,4 [2,23 - 10,13]	5,97 [3,02 - 9,75]	5,8 [3,05 - 9,98]	6,1 [2,53 - 8,59]
Lebenspende, n (%)	224 (31,6 %)	20 (16,95 %)**	13 (15,5 %)*	11 (22,4 %)
ECD, n (%)	228 (32,2 %)	62 (52,54 %)**	42 (50 %)*	30 (65,2 %)**
DDF, n (%)	226 (31,9 %)	57 (48,3 %)**	43 (51,2 %)**	23 (47,9 %)*
Nephrologische Grunderkrankung				
Polyzystische Nierenerkrankung (PKD), n (%)	109 (15,4 %)	25 (21,2 %)	18 (21,4 %)	10 (20,4 %)
Glomerulonephritis, n (%)	88 (12,4 %)	17 (14,4 %)	10 (11,9 %)	8 (16,3 %)
Hypertensive Nephropathie, n (%)	55 (7,8 %)	8 (6,8 %)	5 (5,9 %)	4 (8,2 %)
Diabetische Nephropathie, n (%)	20 (2,8 %)	9 (7,6 %)*	5 (5,9 %)	6 (12,2 %)**
Andere, n (%)	437 (61,6 %)	59 (50 %)*	46 (54,8 %)	21 (42,9 %)*
Komorbiditäten				
Diabetes mellitus, n (%)	160 (22,6 %)	42 (35,9 %)**	29 (34,5 %)*	19 (38,8 %)*
arterielle Hypertonie, n (%)	691 (97,5 %)	118 (100 %)	84 (100 %)	49 (100 %)
koronare Herzerkrankung, n (%)	134 (18,9 %)	43 (36,4 %)**	35 (41,67 %)**	16 (32,7 %)*
periphere arterielle Verschlusskrankheit, n (%)	63 (8,9 %)	18 (15,25 %)*	15 (17,86 %)*	6 (12,2 %)
Herzinsuffizienz, n (%)	297 (41,9 %)	80 (67,8 %)**	59 (70,24 %)**	34 (69,4 %)**
zerebrovaskuläre Erkrankung, n (%)	63 (8,9 %)	16 (13,6 %)	14 (16,67 %)*	5 (10,2 %)
Laborparameter zum Zeitpunkt des Einschlusses				
medianes Plasma-NGAL (pNGAL), (ng/ml) [IQA]	189 [130 - 257]	232,5 [173,75 - 325,75]**	218,5 [160 - 307,5]*	304 [234,5 - 358]**
medianes Urin-NGAL (uNGAL), (ng/ml) [IQA]	29 [12 - 57,75]	38,5 [20,75 - 87]*	32 [16,5 - 75,5]	52 [22 - 141,5]*
medianes Plasma-Calprotectin (pCalpro), (ng/ml) [IQA]	539,5 [335,4 - 913,8]	637,8 [386,76 - 1108,21]*	640,73 [385,86 - 1067,55]	685,3 [421,49 - 1287,26]*
medianes Urin-Calprotectin (uCalpro), (ng/ml) [IQA]	57,6 [13,1 - 301,6]	94,17 [20,39 - 415,52]*	94,17 [22,88 - 421,64]*	76,46 [17,3 - 238,26]
medianes Serumkreatinin (sKrea), (mg/dl) [IQA]	1,53 [1,22 - 1,92]	1,77 [1,33 - 2,39]**	1,59 [1,23 - 2,03]	2,35 [1,82 - 2,92]**
Urinstreifen positive Proteinurie (≥ 30 mg/dl = "+"), n (%)	159 (22,4 %)	46 (38,98 %)**	25 (29,76 %)	31 (63,3 %)**
Nachweis donorspezifischer Antikörper, n (%)	51 (7,2 %)	16 (13,6 %)*	9 (10,7 %)	10 (21,3 %)**

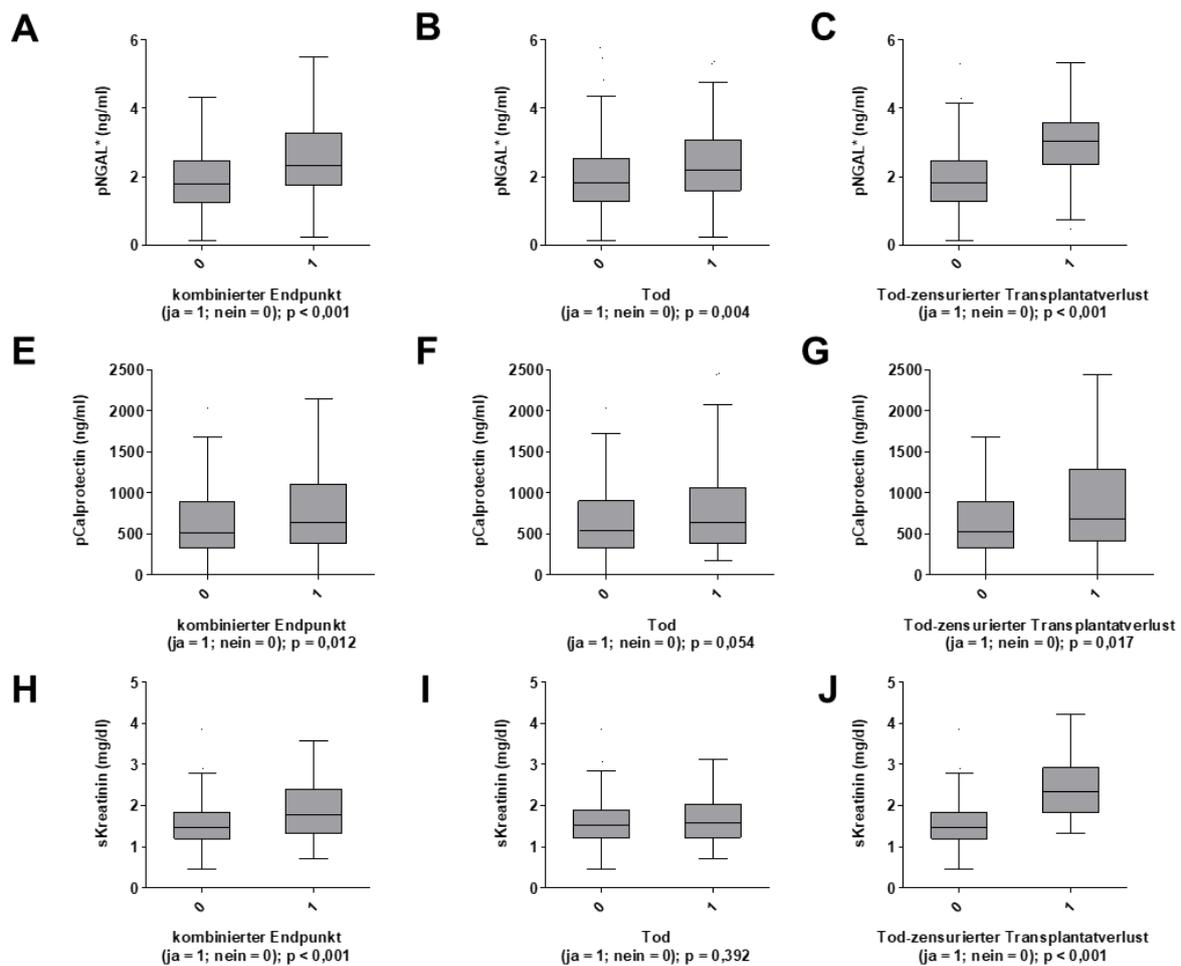


Abbildung 3: Verteilung der Konzentrationen von pNGAL* (A-C), pCalprotectin (D-F), sKreatinin (G-I) in den Kohorten mit und ohne Endpunkt (kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust). Die Boxen zeigen den Median sowie die untere und obere Quartile. Die Begrenzung oberhalb und unterhalb der Boxen kennzeichnet Daten innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes. Die schwarzen Punkte sind Ausreißer. Das p-Signifikanzniveau <math>< 0,05</math> wurde mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. pNGAL* = pNGAL pro 100 ng/ml Anstieg = Zur besseren Veranschaulichung dividierten wir die pNGAL-Werte durch 100.

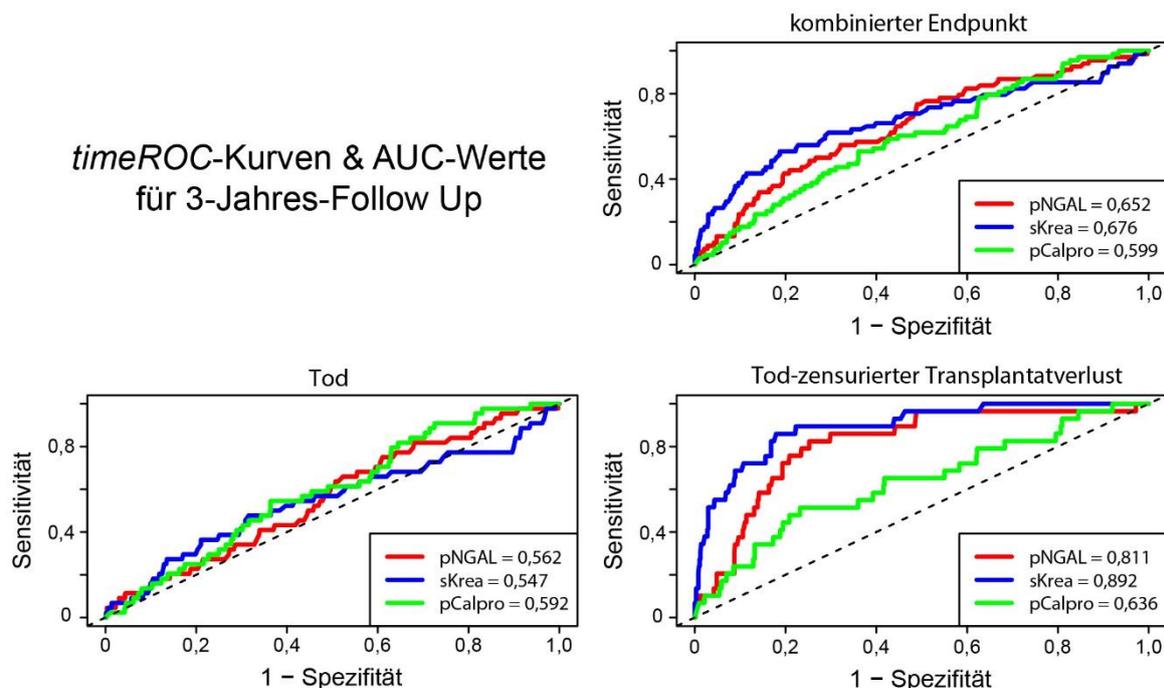
3.3 TESTCHARAKTERISTIKA

Zur Bewertung der Aussagekraft der betrachteten Biomarker pNGAL, pCalpro und sKrea im Hinblick auf die Endpunkte kombinierter Endpunkt aus Tod oder Transplantatverlust, Tod-zensurierter Transplantatverlust und Tod nach drei, vier und fünf Jahren verwendeten wir *timeROC*-Analysen. Zur Bestimmung ihrer Zuverlässigkeit errechneten wir die AUC: Sie liegt

zwischen 0,5 und 1,0, wobei 0,5 keinen aussagekräftigen Gewinn und 1,0 eine absolute Testzuverlässigkeit bedeutet (siehe Abbildung 4).

Für den kombinierten Endpunkt nach drei Jahren liegt die AUC für pNGAL bei 0,65, für pCalpro bei 0,6, für sKrea bei 0,68; nach vier Jahren für pNGAL bei 0,66, für pCalpro bei 0,58, für sKrea bei 0,67 und nach fünf Jahren für pNGAL bei 0,66, für pCalpro bei 0,59 und für sKrea bei 0,65. Betrachtet man Tod-zensuriertes Transplantatversagen nach drei Jahren als Endpunkt, dann beträgt die AUC für pNGAL 0,81, für pCalpro 0,64, für sKrea 0,89; nach vier Jahren für pNGAL 0,81, für pCalpro 0,6, für sKrea 0,89 und nach fünf Jahren für pNGAL 0,8, für pCalpro 0,61 und für sKrea 0,85. Zur Vorhersage von Tod nach drei Jahren beträgt die AUC für pNGAL 0,56, für pCalpro 0,59, für sKrea 0,55; nach vier Jahren für pNGAL 0,58, für pCalpro 0,59, für sKrea 0,54 und nach fünf Jahren für pNGAL 0,6, für pCalpro 0,58 und für sKrea 0,54.

Die beste Testzuverlässigkeit zeigten pNGAL und sKrea zur Vorhersage von Tod-zensuriertem Transplantatverlust. Zur Ermittlung eines Cut-Off-Wertes für beide Parameter nutzten wir die *timeROC*-Kurven für Transplantatverlust mit dem längsten Follow-Up (fünf Jahre) und verglichen die einzelnen NGAL- und sKrea-Werte untereinander anhand ihrer Sensitivitäten und Spezifitäten und wählten denjenigen Wert mit dem höchsten Youden-Index als Cut-Off-Wert aus. Dabei fand sich für pNGAL ein optimaler Cut-Off-Wert von 230 ng/ml und für sKrea ein optimaler Cut-Off-Wert von 1,75 mg/dl (Youden-Index pNGAL 0,5319 und sKrea 0,5125). Die Testcharakteristika für die gewählten Cut-Off-Werte zur Vorhersage der Endpunkte nach drei, vier und fünf Jahren sind in der Tabelle 4 dargestellt.



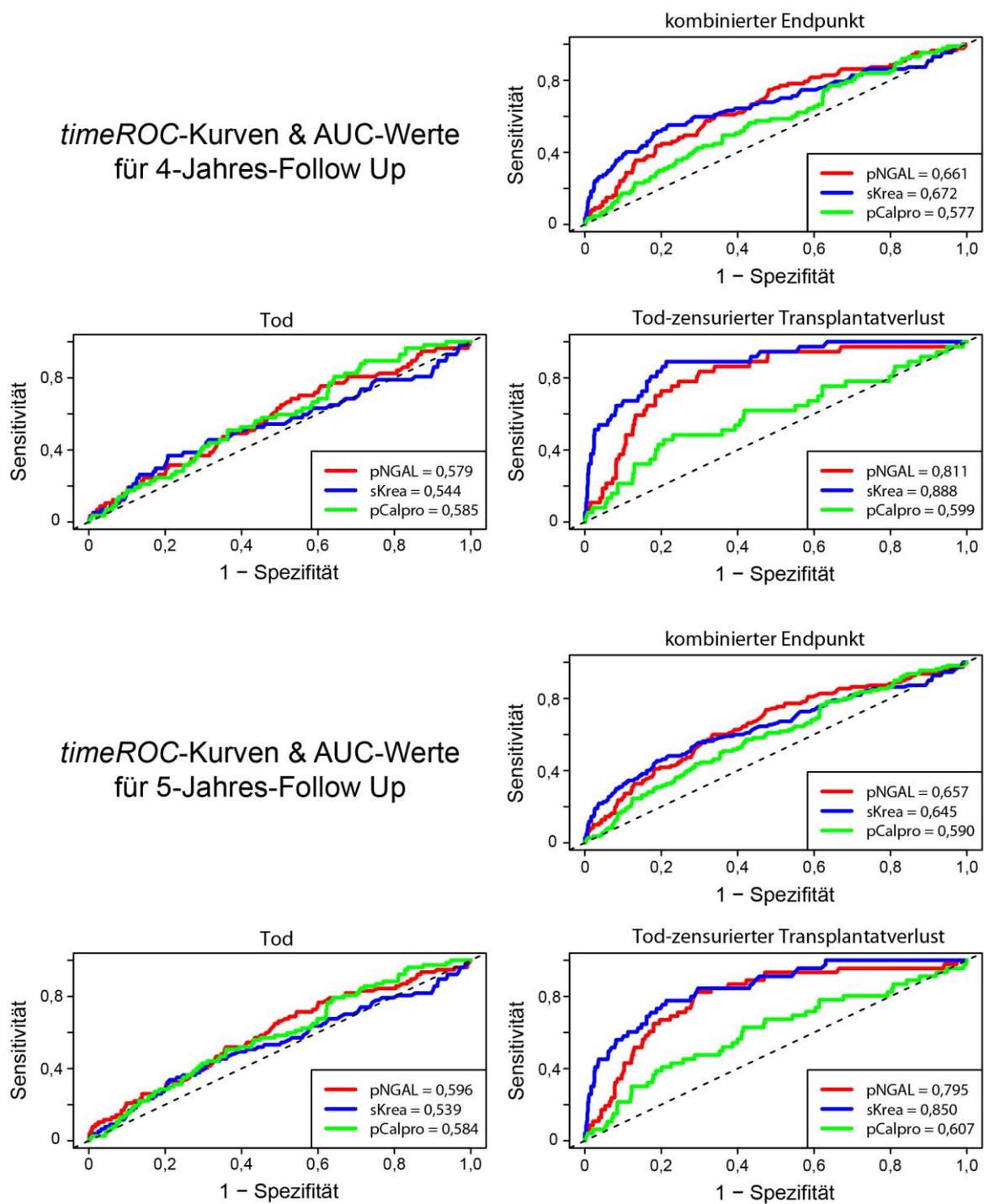


Abbildung 4: timeROC-Kurven und AUC-Werte. Visualisierung der Treffsicherheit von pNGAL (rot), sKrea (blau) und pCalpro (grün) in Bezug auf die Vorhersage des kombinierten Endpunktes, von Tod und Tod-zensurierterm Transplantatverlust nach drei, vier und fünf Jahren. Referenzlinie (schwarz gestrichelt) zeigt AUC = 0,5.

Tabelle 4: Testcharakteristika für den Cut-Off-Wert von pNGAL 230 ng/ml und sKrea 1,75 mg/dl in Abhängigkeit der Überlebenszeit (3, 4, 5 Jahre) bezogen auf die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust. Sens (%) = Sensitivität. Spez (%) = Spezifität. PPW (%) = positiv prädiktiver Wert. NPW (%) = negativ prädiktiver Wert. LR+ = positiver Likelihoodquotient. LR- = negativer Likelihoodquotient.

kombinierter Endpunkt							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert pNGAL (ng/ml)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	230 ng/ml	51,47	69,11	15,02	93,07	1,67	0,70
4-Jahres-Überleben	230 ng/ml	52,87	69,94	19,74	91,39	1,76	0,67
5-Jahres-Überleben	230 ng/ml	52,73	70,78	24,89	89,08	1,80	0,67
kombinierter Endpunkt							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert sKrea (mg/dl)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	61,76	70,51	18,18	94,56	2,09	0,54
4-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	59,77	71,22	22,51	92,68	2,08	0,56
5-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	53,64	71,29	25,54	89,33	1,87	0,65
Tod							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert pNGAL (ng/ml)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	230 ng/ml	34,09	67,22	6,44	93,91	1,04	0,98
4-Jahres-Überleben	230 ng/ml	38,6	67,64	9,44	92,65	1,19	0,91
5-Jahres-Überleben	230 ng/ml	41,56	68,2	13,73	90,55	1,31	0,86
Tod							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert sKrea (mg/dl)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	47,73	68,42	9,09	95,19	1,51	0,76
4-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	45,61	68,56	11,26	93,51	1,45	0,79
5-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	42,86	68,67	14,29	90,79	1,37	0,83
Tod-zensurierter Transplantatverlust							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert pNGAL (ng/ml)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	230 ng/ml	85,97	69,16	10,94	99,11	2,79	0,20
4-Jahres-Überleben	230 ng/ml	83,54	69,99	13,77	98,67	2,78	0,24
5-Jahres-Überleben	230 ng/ml	82,33	70,86	17,12	98,21	2,83	0,25
Tod-zensurierter Transplantatverlust							
<u>Überlebenszeit</u>	<u>Cut-Off-Wert sKrea (mg/dl)</u>	<u>Sens (%)</u>	<u>Spez (%)</u>	<u>PPW (%)</u>	<u>NPW (%)</u>	<u>LR+</u>	<u>LR-</u>
3-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	89,43	70,55	11,8	99,34	3,04	0,15
4-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	89	71,27	15,08	99,12	3,10	0,15
5-Jahres-Überleben	1,75 mg/dl	79,9	71,35	16,93	97,98	2,79	0,28

3.4 PRÄDIKATIONSMODELLE

Um den Einfluss der erhobenen Parameter auf den kombinierten Endpunkt, das Tod-zensurierte Transplantatüberleben und das Patientenüberleben zu erfahren, verwendeten wir univariate Cox-Regressionsanalysen (siehe Tabelle 5). Die für die Endpunkte signifikanten Einflussfaktoren, die zudem klinisch von großem Interesse und im klinischen Alltag einfach zugänglich sind, wurden für die multiple Cox-Regressionsanalyse nach dem Einschlussprinzip ausgewählt. Bereits in den univariaten Analysen waren uNGAL, pCalpro und uCalpro nicht signifikant und konnten somit als Prädiktoren ausgeschlossen werden.

Tabelle 5: Univariate Cox-Regressionen für die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust ausgewählter klinisch signifikanter Parameter. Risikoverhältnis mit 95 %Konfidenzintervall (95 % KI) der Hazard Ratios (HR) dargestellt. p-Signifikanzniveau < 0,05. pNGAL = pNGAL pro 100 ng/ml Anstieg = Zur besseren Veranschaulichung dividierten wir die pNGAL-Werte durch 100.*

Outcome Parameter	Kombinierter Endpunkt			Tod			Transplantatverlust		
	HR	95 % KI	p-Wert	HR	95 % KI	p-Wert	HR	95 % KI	p-Wert
pNGAL*	1,268	1,165 – 1,379	<0,001	1,22	1,086 – 1,371	0,001	1,371	1,250 – 1,504	<0,001
sKrea	2,447	1,908 – 3,138	<0,001	1,227	0,873 – 1,724	0,238	5,254	3,873 – 7,128	<0,001
Proteinurie	2,406	1,66 – 3,487	<0,001	1,492	0,934 – 2,385	0,094	6,417	3,589 – 11,474	<0,001
Alter	1,060	1,043 – 1,076	<0,001	1,075	1,054 – 1,097	<0,001	1,042	1,019 – 1,066	<0,001

Das finale Modell für die Vorhersage des kombinierten Endpunktes beinhaltet die Parameter pNGAL (als Wert pro 100 ng/ml Anstieg), sKrea, Proteinurie und Alter des Patienten (vgl. Tabelle 6). Steigt der pNGAL-Wert um 100 ng/ml an, dann steigt das Risiko den Endpunkt zu erreichen um 20,1 % [95 % KI, 1,011 - 1,426]. sKrea- und Proteinurie- Anstiege hingegen führen zu einem 68,9 % [95 % KI, 1,221 – 2,336] bzw. 86% [95 % KI, 1,239 – 2,793] höheren Risiko für den kombinierten Endpunkt.

In Bezug auf das Gesamtüberleben weisen ausschließlich pNGAL mit einer HR von 1,339 [95 % KI, 1,113 – 1,612] (pro 100 ng/ml Anstieg) und das Patientenalter mit einer HR von 1,076 [95 % KI, 1,042 – 1,075] (pro Lebensjahr) eine signifikante Bedeutung in der Vorhersage auf.

Für die Prädiktion von Transplantatverlust sind alle vier Parameter (pNGAL, sKrea, Proteinurie, Alter) signifikant. Die HR für pNGAL liegt pro 100 ng/ml Anstieg bei 1,30 [95 % KI, 1,043 – 1,622], wohingegen sKrea (pro 1 mg/dl Anstieg) und das Vorliegen von Proteinurie (Urinteststreifenergebnis \geq 30 mg/dl = "+") eine HR > 3 besitzen. Neben der herkömmlichen

Cox-Regression führten wir zusätzlich eine Analyse mit Tod als konkurrierendes Ereignis durch, damit auch Patienten mit einem erhöhten Risiko für Transplantatversagen, die allerdings vor Eintreten des Endpunktes verstorben sind, in der Analyse berücksichtigt werden. Die Signifikanzniveaus für alle vier Parameter (pNGAL, sKrea, Proteinurie und Alter) sind ähnlich derer in der herkömmlichen Analyse. Allerdings fallen die HR in der *Competing Risk* - Methode für pNGAL, Proteinurie und Alter etwas höher und für sKrea etwas niedriger aus: So steigt das Risiko des Transplantatverlustes bei einem Anstieg von pNGAL um 100 ng/ml um 3,4 % auf 33,5 % [95 % KI, 1,142 – 1,56] im *Competing Risk* - Modell. Ein erhöhtes sKrea sowie das Vorliegen von Proteinurie (≥ 30 mg/dl) sind weiterhin mit einem in etwa dreifach höheren Risiko für Transplantatverlust assoziiert (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Prädiktionsmodelle der multiplen Cox-Regression für die Endpunkte kombinierter Endpunkt, Tod, Tod-zensurierter Transplantatverlust und Competing Risk - Analyse für Transplantatversagen. Risikoverhältnis mit 95%Konfidenzintervall (95 % KI) der Hazard Ratios (HR) dargestellt. *p*-Signifikanzniveau $< 0,05$ zur Beschreibung des Beitrags der Parameter zum Modell. pNGAL* = pNGAL pro 100 ng/ml Anstieg = Zur besseren Veranschaulichung dividierten wir die pNGAL-Werte durch 100.

Kombinierter Endpunkt			
Parameter	HR	95 % KI	p-Wert
pNGAL*	1,201	1,011 - 1,426	0,037
sKrea	1,689	1,221 - 2,336	0,002
Proteinurie	1,86	1,239 - 2,793	0,003
Alter	1,058	1,042 - 1,075	<0,001
Tod			
Parameter	HR	95 % KI	p-Wert
pNGAL*	1,339	1,113 - 1,612	0,002
sKrea	0,719	0,455 - 1,136	0,157
Proteinurie	1,506	0,912 - 2,488	0,11
Alter	1,076	1,054 - 1,097	<0,001
Tod-zensuriertes Transplantatversagen		Transplantatversagen mit Tod als Competing Risk	
Parameter	HR	95 % KI	p-Wert
pNGAL*	1,301	1,043 - 1,622	0,02
sKrea	3,168	2,111 - 4,752	<0,001
Proteinurie	3,249	1,687 - 4,752	<0,001
Alter	1,041	1,016 - 1,066	0,001
Parameter	HR	95 % KI	p-Wert
pNGAL*	1,335	1,142 - 1,56	<0,001
sKrea	2,672	1,678 - 4,254	<0,001
Proteinurie	3,405	1,765 - 6,568	<0,001
Alter	1,032	1,008 - 1,056	0,009

3.5 ÜBERLEBENSZEITANALYSEN

Um das kumulative Risiko für das Eintreten eines Endpunktes in Abhängigkeit der Zeit darzustellen, entwickelten wir Kaplan-Meier-Kurven, bei denen das Eintreten der Endpunkte ausgehend vom Einschluss in die Studie t_0 betrachtet wurde. Die Patienten wurden nach pNGAL und sKrea stratifiziert. So stellen diese Analysen das kumulative Auftreten von Endpunkten zwischen Patienten mit pNGAL-Werten über und unter dem Cut-Off von 230 ng/ml gegenüber sowie zwischen Patienten mit sKrea-Werten über und unter dem Cut-Off von 1,75 mg/dl (siehe Abbildung 5). Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt, errechneten wir mittels Log-Rank-Test. Patienten mit pNGAL und sKrea über ihrem Cut-Off-Wert hatten ein signifikant höheres Risiko von 21,58 % [95 % KI, 1,169 – 1,273] bzw. 23,11 % [95 % KI, 1,183 – 1,29] nach vier Jahren den kombinierten Endpunkt zu erreichen. Nach vier Jahren waren außerdem 12,3 % [95 % KI, 1,0852 – 1,169] der Patienten mit erhöhten pNGAL-Werten und 12,97% [95 % KI, 1,093 – 1,169] der Patienten mit erhöhten sKrea-Werten verstorben. Einen signifikanten Unterschied zeigt ebenfalls das kumulative Risiko für Transplantatverlust nach vier Jahren, welches für Patienten mit pNGAL \geq 230 ng/ml 15,12 % [95 % KI, 1,111 – 1,204] und mit sKrea \geq 1,75 mg/dl 15,91 % [95 % KI, 1,117 – 1,214] und im Gegensatz dazu für Patienten mit Werten unterhalb des Cut-Offs nur bei 1,35 % [95 % KI, 0,006 - 0,03] bzw. 1,12 % [95 % KI, 1,005 – 1,027] liegt ($p < 0,001$).

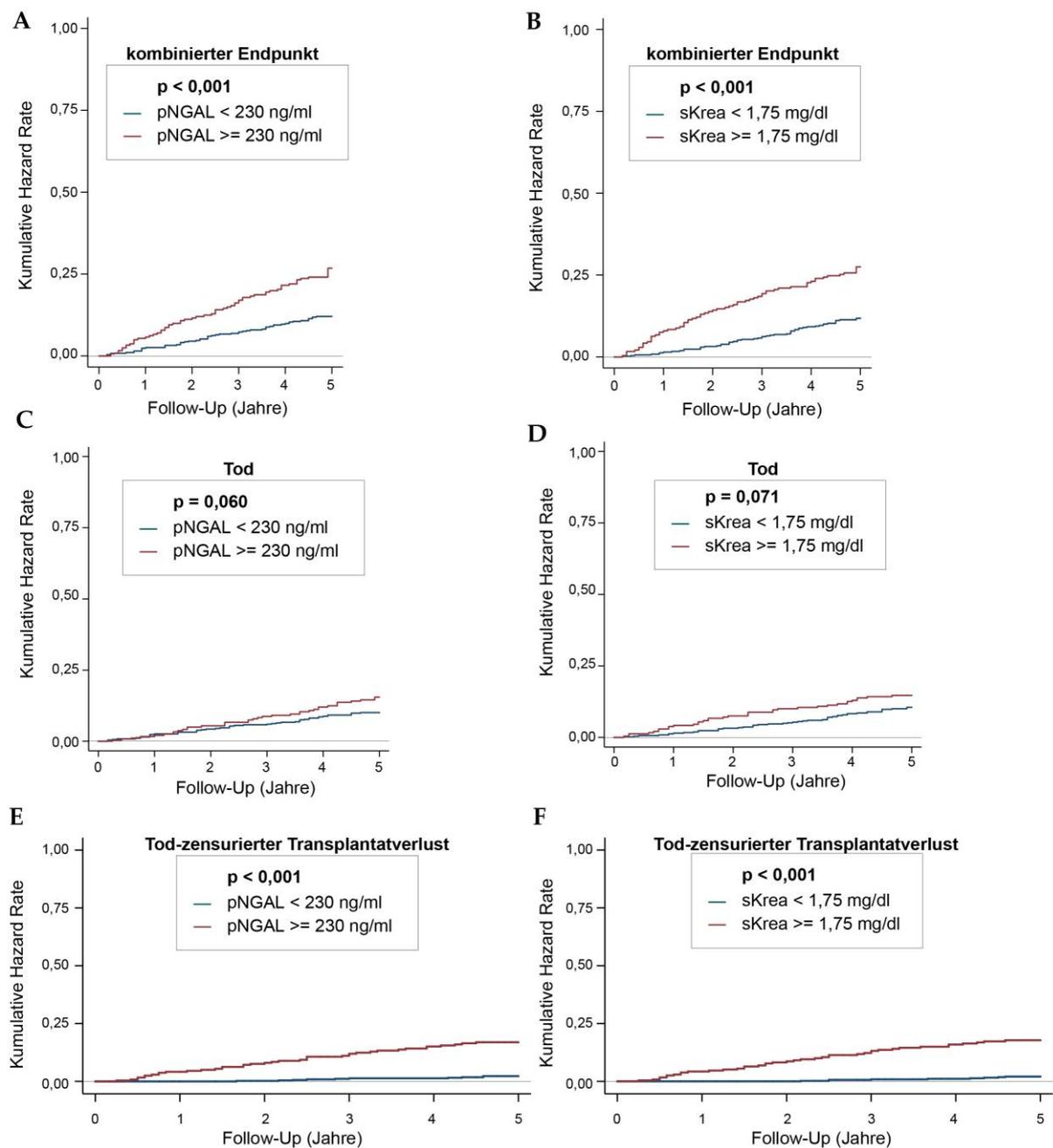


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen. Darstellung der kumulativen Hazard Raten für den kombinierten Endpunkt (A, B), Tod (C, D) und Tod-zensurierten Transplantatverlust (E, F) in Abhängigkeit der Zeit bei einem maximalen Follow-Up von knapp fünf Jahren. Der Zeitpunkt 0 in dieser Analyse entspricht dem Zeitpunkt der Messung von pNGAL und sKrea beim Studieneinschluss. Es werden die kumulativen Hazard Raten von Patienten mit pNGAL-Werten \geq (rot) und $<$ (blau) dem Cut-Off-Wert von 230 ng/ml sowie mit sKrea-Werten \geq (rot) und $<$ (blau) dem Cut-Off-Wert von 1,75 mg/dl miteinander verglichen. Der Signifikanzwert $p < 0,05$ wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Des Weiteren bildeten wir Risikogruppen, in denen pNGAL- und sKrea-Werte gemeinsam betrachtet werden, um den Nutzen einer Kombination des neuen Markers pNGAL mit dem konventionellen Routineparameter sKrea zu analysieren: So konnten wir in Bezug auf Transplantatversagen über die Zeit ein signifikant höheres kumulatives Risiko von 21,9 % [95 % KI, 1,161 – 1,294] für Patienten mit sowohl pNGAL- als auch sKrea-Werten über ihrem Cut-Off im Gegensatz zu Patienten, die nur isoliert ein erhöhtes sKrea (kumulative Hazard Ratio (kHR): 2,52 % [95 % KI, 1,006 – 1,097]) besitzen, nachweisen ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 6).

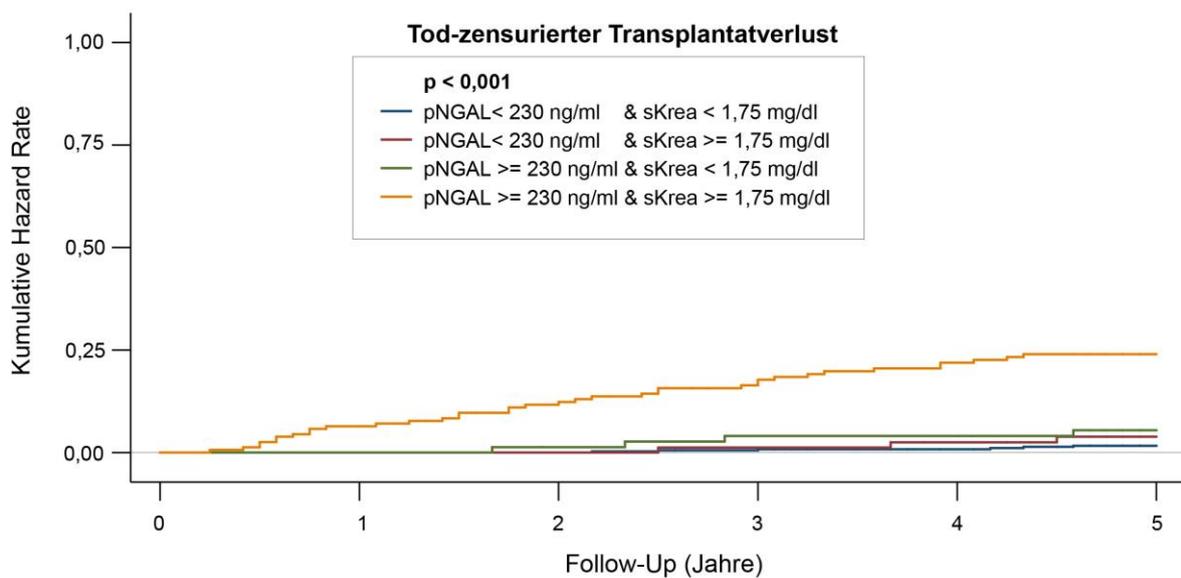


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für Risikogruppen. Darstellung der kumulativen Hazard Raten für Tod-zensurierten Transplantatverlust in Abhängigkeit der Zeit bei einem maximalen Follow-Up von knapp fünf Jahren. Es werden Patientengruppen mit pNGAL-Werten \geq dem Cut-Off-Wert von 230 ng/ml und sKrea-Werten \geq dem Cut-Off-Wert von 1,75 mg/dl (orange) gegenüber Kohorten mit entweder pNGAL \geq 230 ng/ml und sKrea $<$ 1,75 mg/dl (grün) oder pNGAL $<$ 230 ng/ml und sKrea \geq 1,75 mg/dl (dunkelrot) oder pNGAL $<$ 230 ng/ml und sKrea $<$ 1,75 mg/dl (blau) miteinander verglichen. Der Signifikanzwert $p < 0,05$ wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Für die vorgenannten Überlebensanalysen legten wir den Zeitpunkt des Studieneinschlusses als t_0 fest. Dieser Zeitpunkt war definiert durch das Einschlusszeitfenster unserer Studie, bedingte aber, dass wir Patienten zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation betrachteten, d. h. die Studienpopulation wies eine erhebliche Heterogenität bezüglich des Transplantalters zum Zeitpunkt der Biomarkerbestimmung auf. Aus diesem Grunde führten wir eine zweite explorative Überlebensanalyse durch, bei der der Zeitpunkt der Transplantation als t_0 definiert wurde (siehe Abbildung 7). Diese Analyse bestätigt die Ergebnisse der vorgenannten Überlebensanalysen. Betrachtet man das Tod-zensurierte

Transplantatüberleben ausgehend vom Zeitpunkt der Transplantation, dann diskriminiert pNGAL genau wie sKrea (gemessen zum Studieneinschluss, also zu einem zufälligen Zeitpunkt nach der Transplantation) diejenigen Patienten mit einem kürzeren Transplantatüberleben ($p < 0,001$). Wiederum zeigte sich, dass Patienten mit sowohl erhöhtem pNGAL als auch erhöhtem sKrea das höchste Risiko eines Transplantatverlustes aufwiesen.

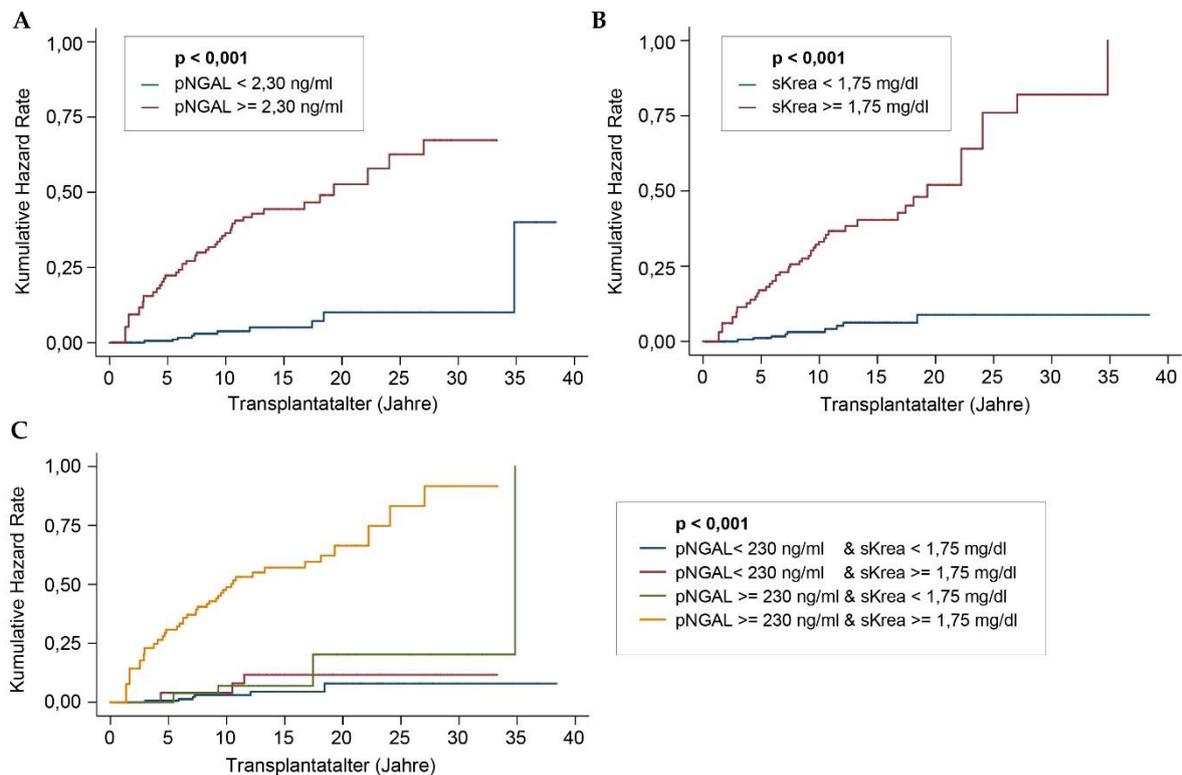


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für Tod-zensurierten Transplantatverlust in Abhängigkeit des Transplantatalters. Das Transplantatalter wird in Jahren vom Zeitpunkt 0 = Transplantation angegeben. **A, B:** Darstellung der kumulativen Hazard Rates von Patienten mit pNGAL-Werten \geq (rot) und $<$ (blau) dem Cut-Off-Wert von 230 ng/ml sowie mit sKrea-Werten \geq (rot) und $<$ (blau) dem Cut-Off-Wert von 1,75 mg/dl. **C:** Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen für Risikogruppen. Darstellung der kumulativen Hazard Rates für Tod-zensurierten Transplantatverlust in Abhängigkeit der Zeit in Jahren nach Transplantation. Es werden Patientengruppen mit pNGAL-Werten \geq dem Cut-Off-Wert von 230 ng/ml und sKrea-Werten \geq dem Cut-Off-Wert von 1,75 mg/dl (orange) gegenüber Kohorten mit entweder pNGAL \geq 230 ng/ml und sKrea $<$ 1,75 mg/dl (grün) oder pNGAL $<$ 230 ng/ml und sKrea \geq 1,75 mg/dl (dunkelrot) oder pNGAL $<$ 230 ng/ml und sKrea $<$ 1,75 mg/dl (blau) miteinander verglichen. Der Signifikanzwert $p < 0,05$ wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Bemerkenswert war in beiden Risikogruppenanalysen, dass Patienten mit hohen Kreatininwerten, aber niedrigen pNGAL-Werten ein niedriges Risiko des Transplantatverlustes zeigten (vergleichbar mit den Patientengruppen, die niedrige Kreatininwerte aufwiesen). Dies legt nahe, dass pNGAL zur Risikostratifizierung von transplantierten Patienten mit erhöhten Kreatininwerten hilfreich sein könnte.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Promotionsarbeit galt es zu klären, ob die Biomarker für intrinsische Nierenschädigung Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin und Calprotectin gemessen im Urin und Plasma von Nierentransplantierten zu einem stabilen Zeitpunkt im Rahmen der chronischen Transplantatnachsorge einen prognostischen Nutzen für den klinischen Alltag besitzen. Es sollte evaluiert werden, ob NGAL und Calprotectin als punktuelle Messwerte Langzeitergebnisse vorhersagen können. Dafür führten wir eine monozentrische, prospektive Observationsstudie von 709 stabilen, mindestens zwei Monate lang nierentransplantierten Empfängern mit einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 58 Monaten durch, bei denen zum Einschlusszeitpunkt NGAL- und Calprotectin-Konzentrationen in Blut und Urin gemessen wurden. Es kam kumulativ zu 118 Ereignissen von Nierentransplantatverlust und Tod; einzeln betrachtet verstarben 84 Patienten und 49 verloren ihr Transplantat unabhängig von Todesfällen. Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere pNGAL einen Nutzen zur Risikostratifizierung dieser Patienten haben könnte.

Es gibt bisher nur sehr limitierte Daten zur prognostischen Bedeutung von NGAL vor allem in stabilen Nierentransplantierten und keine Veröffentlichungen über Calprotectins Wertigkeit in der Langzeitprognose. Die meisten Arbeiten konnten eine hohe Diskriminierungsfähigkeit für beide Biomarker im Setting des akuten Nieren- und auch Nierentransplantatversagens zeigen. Die AUC zur Vorhersage von DGF für NGAL in Urin und Plasma liegt zusammen betrachtet bei ca. 0,87 laut eines Reviews von Haase-Fielitz et al. aus 2014. Außerdem gebe es keinen Unterschied in der Güte von pNGAL und uNGAL, obwohl die meisten Untersuchungen im Urin erfolgt sind (Haase-Fielitz et al. 2014). Für Calprotectin hingegen gibt es innerhalb der nephrologischen Forschung ausschließlich Veröffentlichungen über Urinmessungen. Die AUC für akutes intrinsisches Nierentransplantatversagen beträgt laut Seibert et al. 0,94 (Seibert et al. 2017). Es gibt darüber hinaus einige gute Daten, dass NGAL in der Vorhersage von Nierenfunktionsverlust bis hin zur Notwendigkeit von Nierenersatztherapie und Mortalität nützlich sein könnte (Hall et al. 2011; Nickolas et al. 2008, 2012; Schrezenmeier et al. 2017; Singer et al. 2016), was wiederum für Calprotectin bisher nicht bekannt ist und sogar ganz im Gegenteil kein Zusammenhang zwischen Calprotectin und Nierenfunktionsverschlechterung in chronisch Niereninsuffizienten belegt werden konnte (Seibert et al. 2018). Allerdings fehlen zudem pNGAL- Studien in der chronischen Phase nach Nierentransplantation. Man weiß laut Bansal et al. nur, dass erhöhte NGAL-Level im Urin bei stabilen Nierentransplantierten mit einem erhöhten Risiko für Transplantatverlust, kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität assoziiert sind (Bansal et al. 2016).

Wir konnten in unserer Kohorte zunächst bei Patienten mit kombiniertem Endpunkt aus Transplantatverlust und Tod für beide Biomarker sowohl im Blut als auch im Urin signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Nichtbetroffenen messen. Patienten, die nur einen Transplantatverlust erlitten, hatten keine signifikant erhöhten uCalprotectin-Werte und diejenigen, die verstarben, zeigten keine Assoziation mit erhöhten uNGAL- und pCalprotectin-Werten. Nur pNGAL zeigte bei allen Endpunkten eine signifikante Erhöhung. Aufgrund dessen, weil es bisher keinerlei Veröffentlichungen zu NGALs prognostischer Wertigkeit im Plasma von stabilen Nierentransplantierten gibt und weil im klinischen Alltag zur Funktionsbeurteilung des Nierentransplantates die Kreatininmessungen ebenfalls im Serum durchgeführt werden, legten wir zur besseren Vergleichbarkeit das Hauptaugenmerk auf die im Plasma gemessenen Biomarker.

Im nächsten Schritt analysierten wir die zeitabhängige Testqualität der Biomarker im Vergleich zum Goldstandard Serumkreatinin. Es kann eindeutig festgehalten werden, dass pNGAL, pCalpro und sKrea egal ob nach drei, vier oder fünf Jahren in der Diskriminierung des kombinierten Endpunktes sowie der Patientenmortalität nur als Zufallsklassifikatoren agieren (kombinierter Endpunkt, AUC nach drei, vier und fünf Jahren: pNGAL 0,652, 0,661, 0,657; sKrea 0,676, 0,672, 0,645; pCalpro 0,599, 0,577, 0,59; Tod, AUC nach drei, vier und fünf Jahren: pNGAL 0,562, 0,579, 0,596; sKrea 0,547, 0,544, 0,539; pCalpro 0,592, 0,585, 0,584).

Nur die *timeROC*-Kurven für Transplantatverlust zeigen eine gute Testqualität für pNGAL und sKrea auf: So ist die AUC für pNGAL nach drei und vier Jahren 0,811 und nach fünf Jahren 0,795; sKrea wiederum ist leicht überlegen mit AUC-Werten nach drei Jahren von 0,892, nach vier Jahren 0,888 und nach fünf Jahren 0,85. pCalpro kann auch in der Vorhersage von Transplantatverlust zu keinem Zeitpunkt überzeugen (AUC nach drei, vier und fünf Jahren 0,636, 0,599, 0,607). Dies unterstreicht einerseits, dass es bisher keine Analysen zu pCalprotectin im Bereich der Nierentransplantation gibt und dass laut Seibert et al. kein Zusammenhang zwischen Nierenfunktionsverschlechterung und uCalprotectin in chronischer Niereninsuffizienz besteht (Seibert et al. 2018). Erhöhte pCalprotectin-Werte mögen durch andere ablaufende systemische Inflammationsprozesse bedingt sein; so wie man auch weiß, dass z.B. bei rheumatoider Arthritis oder kardiovaskulärer Erkrankung Calprotectinerhöhungen im Plasma zu messen sind (Altwegg et al. 2007; Hammer et al. 2008).

In den publizierten Daten variieren die ermittelten Cut-Off-Werte für NGAL im Urin und Plasma stark, sodass wir für unsere Kohorte anhand der *timeROC*-Kurve für das 5-Jahres-Transplantatüberleben den bestmöglichen pNGAL-Cut-Off-Wert ermittelten. Dieser liegt bei 230 ng/ml mit einer guten Sensitivität über 80 % und Spezifität von ca. 70 % zu allen Zeitpunkten (drei, vier und fünf Jahren). Allerdings sind nur der negativ prädiktive Wert (NPW) und der negative Likelihoodquotient (-LR) überzeugend (NPW zwischen 98 - 99 % und -LR < 0,3). Ähnliches, aber mit einer etwas stärkeren Sensitivität bis 89 % und einem knapp

akzeptablen positiven Likelihoodquotienten > 3 gilt für den in unserer Kohorte ermittelten Cut-Off-Wert von Serumkreatinin mit 1,75 mg/dl.

Im nächsten Schritt war das Ziel ein Biomarker-assistiertes Vorhersagemodell für die betrachteten Endpunkte zu schaffen. Bereits in den univariaten Cox-Regressionen zeigte Calprotectin weder in Urin noch Plasma signifikante Werte, sodass feststeht, dass Calprotectin in dieser Kohorte von Nierentransplantierten keinen prädiktiven Nutzen besitzt. Für uNGAL konnte zwar univariat ein signifikanter Zusammenhang mit Transplantatverlust ($p = 0,024$) ermittelt werden, dieser hielt allerdings dem stärkeren pNGAL nicht stand, sodass im finalen multivariaten Modell nur pNGAL berücksichtigt wurde. Die Auswahl der Parameter für das Vorhersagemodell wurde stark auf Werte eingegrenzt, die standardmäßig in der Routinenachsorge von Nierentransplantierten ermittelt werden und somit immer ohne Extraaufwand zum Konsultationszeitpunkt zur Verfügung stehen. So haben wir uns auf Serumkreatinin, Proteinurie und das Alter der Patienten beschränkt. Für die Vorhersage des kombinierten Endpunkts sind alle vier Parameter unabhängig prädiktiv. Betrachtet man die Patientenmortalität, dann zeigen nur pNGAL und das Patientenalter einen unabhängigen Einfluss: Steigt pNGAL um 100 ng/ml, dann steigt das Mortalitätsrisiko um 34 %. Für das Prädiktionsmodell von Tod-zensuriertem Transplantatverlust sind wiederum alle vier Parameter signifikant. Dies konnte mittels zusätzlichen konkurrierenden Ereignis-Analysen bestätigt werden: Zwar stellt ein erhöhtes Serumkreatinin und eine erhöhte Proteinurie ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für Transplantatverlust dar, doch können wir auch für pNGAL hervorheben, dass ein Anstieg von 100 ng/ml eine Risikoerhöhung um 30,1 % in den konventionellen Cox-Regressionen und 33,5 % in der *Competing Risk* - Analyse bedeutet.

Die ermittelten Cut-Off-Werte für pNGAL und sKrea wurden weiterverwendet, um den Unterschied im kumulativen Risiko abhängig von der Überschreitung des Grenzwertes in Form von Kaplan-Meier-Überlebensgraphen darzustellen. Dabei wurde nicht nur die unabhängige Signifikanz von $pNGAL \geq 230$ ng/ml vor allem in Bezug auf den Transplantatverlust innerhalb von fünf Jahren nach pNGAL-Bestimmung sowie vom Zeitpunkt der Transplantation gezeigt, sondern auch der Zusatznutzen von pNGAL zu sKrea analysiert: Bildet man Risikogruppen, die entweder nur erhöhte pNGAL- oder nur erhöhte sKrea- Werte oder sowohl erhöhte oder erniedrigte pNGAL- als auch sKrea-Werte besitzen, dann ist der Unterschied in der Risikoerhöhung für Transplantatverlust eindrucklich, wenn nicht nur sKrea sondern zusätzlich auch pNGAL den Cut-Off-Wert überschreiten ($pNGAL \geq 230$ ng/ml UND $sKrea \geq 1,75$ mg/dl: kHR 21,9% [95 % KI, 1,161 – 1,294] im Vergleich zu $pNGAL < 230$ ng/ml UND $sKrea \geq 1,75$ mg/dl: kHR 2,52% [95 % KI, 1,006 – 1,097]; $p < 0,001$). Daraus lässt sich ableiten, dass Nierentransplantierte, deren $sKrea \geq 1,75$ mg/dl beträgt, nur mit einem zusätzlich erhöhten $pNGAL \geq 230$ ng/ml ein signifikant höheres Risiko von ca. 22 % für Transplantatverlust innerhalb von vier Jahren im Vergleich zu isolierter Kreatininerhöhung mit 2,5 % besitzen.

pNGALs prädiktive Eigenschaft zum Zeitpunkt der stabilen Transplantatfunktion konnte bei der Betrachtung des Transplantatgesamtüberlebens bestätigt werden: Bei sowohl erhöhten sKrea- als auch pNGAL-Werten ist das Risiko sein Transplantat nach fünf Jahren post transplantationem zu verlieren ca. 30 % und nach zehn Jahren bereits bei circa 50 %.

In der Gesamtheit zeigen unsere Analysen, dass ausschließlich NGAL im Plasma gemessen einen unabhängigen prädiktiven Wert für die Vorhersage des kombinierten Endpunktes, der Patientenmortalität und des Tod-zensurierten Transplantatverlusts innerhalb von knapp fünf Jahren nach Bestimmung besitzt. Die Signifikanzniveaus und Hazard Ratios verraten aber auch, dass weiterhin der Goldstandard Serumkreatinin sowie die Proteinurie die stärkeren Prädiktoren für den kombinierten Endpunkt und Transplantatverlust darstellen. In der Prädiktion von Mortalität setzt sich pNGAL gegenüber herkömmlichen Nierenfunktionsparametern durch, allerdings überzeugen weder die *time*ROC-Kurven und AUC-Werte noch die Kaplan-Meier-Graphen. Für den klinischen Alltag konnte ein Cut-Off-Wert von pNGAL zur Diskriminierung von Hochrisikopatienten für vor allem Transplantatverlust vorgeschlagen werden, der mit seiner Testgüte überzeugt und der genutzt werden kann, um Patienten mit erhöhten Kreatininwerten bezüglich ihres Risikos für Transplantatverlust näher zu stratifizieren.

Die gezeigten Ergebnisse sind konsistent mit den bisher veröffentlichten Daten über NGAL und seine Vorhersagekraft für Transplantatfunktionsverschlechterung bis zu fünf Jahren (Lacquaniti et al. 2016) und Transplantatverlust bis zu einem Jahr nach Nierentransplantation (Choi et al. 2013; Fonseca et al. 2013; Jafari et al. 2017). Allerdings wurden dabei NGAL-Messungen bis maximal sieben Tage nach Transplantation verwendet und nur Lacquaniti et al. und Jafari et al. beschäftigten sich auch mit NGAL im Plasma und nicht wie viele Autoren nur mit uNGAL (Jafari et al. 2017; Lacquaniti et al. 2016). Für die chronische Phase nach Nierentransplantation ist nur wenig bekannt: Schaub et al. konnten 2009 in 214 Nierentransplantierten, bei denen zwischen Monat drei und sechs nach Nierentransplantation eine Protokollbiopsie durchgeführt wurde, nachweisen, dass erhöhte uNGAL-Werte mit subklinischer Tubulitis und interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie einhergehen (Schaub et al. 2009). Durch Bansal et al. wurde 2016 anhand einer post hoc-Analyse eines Fall-Kontroll-Studiendesigns mit 1027 Patienten aus der FAVORIT-Studie der Zusammenhang zwischen Urin-Biomarkern, u.a. uNGAL, und schlechten Langzeitergebnissen (u.a. Transplantatverlust n=257; Tod n=359) untersucht. Die eingeschlossenen Patienten waren mindestens sechs Monate transplantiert und hatten eine stabile Transplantatfunktion (eGFR > 30 ml/min für Männer, eGFR > 25 ml/min für Frauen) zum Zeitpunkt der Biomarkerbestimmung. Es wurde im Mittel 3,9 (± 1,6) Jahre nachverfolgt. Die Fragestellung der Studie ähnelt unserem Studiendesign, konnten wir doch auf ein längeres Follow-Up im Rahmen eines prospektiv, observierenden Studiendesigns zurückgreifen. Anders als wir benutzten Bansal et al. auf Urin-Kreatininkonzentration standardisierte uNGAL-Werte; hingegen wurden die Proben vergleichbar zu einem beliebigen stabilen Zeitpunkt nach Transplantation entnommen. Sie

konnten zeigen, dass jede logarithmische Erhöhung der uNGAL/Kreatinin-Konzentration mit einem um 40 % [95 % KI, 1,16 – 1,68] höheren Risiko für Transplantatverlust assoziiert ist (Bansal et al. 2016). Im Gegensatz dazu konnten wir in unserer Studie keinerlei Signifikanz für absolute uNGAL-Werte feststellen. Dafür konnten wir erstmals für pNGAL im Median 5,4 [IQA 2,23 - 10,13] Jahre nach Transplantation gemessen einen unabhängigen prädiktiven Nutzen für die Vorhersage von Transplantatverlust in einem 5-Jahres-Follow-Up mit einer Hazard Ratio von bis zu 1,335 (95 % KI, 1,142 - 1,56) zeigen, die wir, im Gegensatz zu Bansal et al., zum Ausschluss von konkurrierenden Ereignissen zusätzlich mithilfe der *Competing Risk* - Analysen und nicht nur mit der Bildung von kombinierten Endpunkten statistisch bestätigten. Wie allerdings Nauta et al. bereits 2011 für uNGAL festhielten, konnten auch wir keine Überlegenheit von pNGAL gegenüber den herkömmlichen Nierenfunktionsparametern (Nauta et al. 2011: Proteinurie) darstellen. Nichtsdestotrotz konnten wir einen Zusatznutzen der Kombination von pNGAL mit sKrea bei stabilen Nierentransplantierten zur verbesserten Risikoeinschätzung von Transplantatverlust zeigen, so wie es in anderen klinischen Settings des akuten oder chronischen Nierenversagens bereits in mehreren Studien belegt werden konnte (Ronco et al. 2014). Darüber hinaus zeigt pNGAL einen unabhängigen prädiktiven Nutzen für Mortalität mit einer Hazard Ratio von 33,9 % [95 % KI, 1,113 - 1,612]. Bansal et al. konnte dies für uNGAL/Kreatinin ebenfalls bestätigen (aHR: 1,44 [95% KI, 1,26 – 1,65]) (Bansal et al. 2016). Ronco et al. fassten in ihrer Veröffentlichung 2014 die pathophysiologische und klinische Relation von NGAL und kardiovaskulären Erkrankungen zusammen und zeigten auf, dass NGAL in einigen Studien ein unabhängiger Prädiktor für schwerwiegende unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse und Sterblichkeit ist. Dies könnte auf die hohe Expression von NGAL in atherosklerotischen Plaques zurück zu führen sein (Ronco et al. 2014). Ein weiterer Erklärungsansatz durch Bansal et al. ist, dass durch die Schwere der Tubulusschädigung viele physiologische Stoffwechselwege beeinträchtigt sind, deren Dysfunktion wie in der chronischen Niereninsuffizienz bekannt ein höheres Mortalitätsrisiko bedingen (Bansal et al. 2016).

Es ist zu betonen, dass diese Studie Limitationen aufweist: Zum einen handelt es sich um eine monozentrische Studie, sodass die Vorhersagekraft von pNGAL auch in multizentrischen Studien bestätigt werden muss. Zum anderen wurden die Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation eingeschlossen, was zu einem Überlebensbias der Gesunden geführt haben könnte und einen Vergleich der Patienten und ihres Risikos für Transplantatverlust und Mortalität schwierig macht. Es wäre daher ratsam, die prädiktive Kapazität zu einem definierten Zeitpunkt nach der Transplantation zu untersuchen. Der Cut-Off-Wert wurde anhand des Outcomes Transplantatverlust ermittelt und gilt damit möglicherweise nicht für andere Endpunkte wie die Patientenmortalität. Zudem ist zu klären, ob dieser Cut-Off-Wert auch für andere Kohorten nützlich ist. Außerdem wurde die Variable Proteinurie als kategorial und nicht metrisch betrachtet und die Definition auf Ergebnissen des ungenauen, semiquantitativen Urinstix-Testes basiert. In weiteren Studien sollte eine

quantitative Analyse von z.B. Albumin/Kreatinin-Ratio zur präziseren Einordnung der Schwere der Proteinurie/ Albuminurie verwendet werden, da diese laut Nauta et al. einen unabhängigen, prädiktiven Wert für die betrachteten Endpunkte besitzt (Nauta et al. 2011). Darüber hinaus wurden weitere mögliche systemische Einflussfaktoren auf die pNGAL-Konzentration nicht in die Analysen mit einbezogen, auch wenn aus der Literatur z.B. bekannt ist, dass Immunsuppressiva-Regime mit CNI einen signifikanten Einfluss auf die Höhe des pNGAL-Spiegels haben (Bleskestad et al. 2017).

Die Stärken dieser Studie sind, dass es nach unserem Kenntnisstand die erste Studie ist, die den prädiktiven Wert von pNGAL und Calprotectin auf das Transplantat- und Patientenüberleben bei stabilen Nierentransplantierten untersucht hat. Außerdem wurde diese Studie an einer relativ großen Anzahl von Teilnehmern durchgeführt und hat eine angemessene Dauer der Nachbeobachtung. Für die Analyse des Tod-zensurierten Transplantatverlustes wurde neben der multivariaten Cox-Regression eine *Competing Risk* - Analyse durchgeführt, um das Risiko derer Patienten, die vor Eintritt des Endpunktes verstorben sind, nicht zu unterschätzen (Noordzij et al. 2013).

Zusammenfassend konnten wir in unserer prospektiven, monozentrischen Beobachtungsstudie mit 709 stabilen Nierentransplantierten zeigen, dass pNGAL in punktueller Messung während der Routinenachsorge einen unabhängigen prädiktiven Nutzen zur Vorhersage von Transplantatverlust und Mortalität besitzt. Es konnte eine Überlegenheit von pNGAL gegenüber den herkömmlichen Nierenfunktionsparametern Serumkreatinin und Proteinurie in Bezug auf die Vorhersage von Mortalität gezeigt werden. Für die Risikoabschätzung von Transplantatverlust konnten wir für pNGAL einen Zusatznutzen zum Serumkreatinin darstellen, der zukünftig zur besseren Entscheidungsfindung und Therapieoptimierung bei Patienten mit erhöhtem Serumkreatinin beitragen könnte.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abedini, Sadollah, Ingar Holme, Winfried März, Gisela Weihrauch, Bengt Fellström, Alan Jardine, Edward Cole, Bart Maes, Hans-Hellmut Neumayer, Carola Grønhaugen-Riska, Patrice Ambühl, Hallvard Holdaas, and on behalf of the ALERT study Group.** 2009. "Inflammation in Renal Transplantation." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 4(7):1246–54.
- Almond, P. S., A. Matas, K. Gillingham, D. L. Dunn, W. D. Payne, P. Gores, R. Gruessner, and J. S. Najarian.** 1993. "Risk Factors for Chronic Rejection in Renal Allograft Recipients." *Transplantation* 55(4):752-6; 756-7.
- Altwegg, Lukas A., Michel Neidhart, Martin Hersberger, Simone Müller, Franz R. Eberli, Roberto Corti, Marco Roffi, Gabor Sütsch, Steffen Gay, Arnold von Eckardstein, Manfred B. Wischnewsky, Thomas F. Lüscher, and Willibald Maier.** 2007. "Myeloid-Related Protein 8/14 Complex Is Released by Monocytes and Granulocytes at the Site of Coronary Occlusion: A Novel, Early, and Sensitive Marker of Acute Coronary Syndromes." *European Heart Journal* 28(8):941–48.
- Anders, Hans-Joachim.** 2010. "Toll-Like Receptors and Danger Signaling in Kidney Injury." *J Am Soc Nephrol* 21:1270–1274.
- Bagshaw, Sean M., Carol George, Irina Dinu, and Rinaldo Bellomo.** 2008. "A Multi-Centre Evaluation of the RIFLE Criteria for Early Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23(4):1203–10.
- Bansal, Nisha, Myra A. Carpenter, Daniel E. Weiner, Andrew S. Levey, Marc Pfeffer, John W. Kusek, Jianwen Cai, Lawrence G. Hunsicker, Meyeon Park, Michael Bennett, Kathleen D. Liu, and Chi-Yuan Hsu.** 2016. "Urine Injury Biomarkers and Risk of Adverse Outcomes in Recipients of Prevalent Kidney Transplants: The Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation Trial." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27(7):2109–21.
- Beckmann, J., R. Lück, and J. Klempnauer.** 2009. "Nierentransplantation." *Allgemein- Und Viszeralchirurgie Up2date* 3(02):115–30.
- Bellomo, Rinaldo, Claudio Ronco, John A. Kellum, Ravindra L. Mehta, Paul Palevsky, and the ADQI Acute Dialysis Quality Initiative workgroup.** 2004. "Acute Renal Failure - Definition, Outcome Measures, Animal Models, Fluid Therapy and Information Technology Needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group." *Critical Care (London, England)* 8(4):R204-12.
- Bennett, Michael, Catherine L. Dent, Qing Ma, Sudha Dastrala, Frank Grenier, Ryan**

- Workman, Hina Syed, Salman Ali, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan.** 2008. "Urine NGAL Predicts Severity of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery: A Prospective Study." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 3(3):665–73.
- BioPorto Diagnostics A/S, Tuborg Havnevej 15, DK-2900 Hellerup.** 2016. "THE NGAL TEST™ REAGENT KIT ST001CA." Retrieved January 31, 2019 (<http://www.bioporto.com/Files/Images/IFU-and-Coa/IFU-multilingual-2016.pdf>).
- Birnbaum, Leora M., Mark Lipman, Steven Paraskevas, Prosanto Chaudhury, Jean Tchervenkov, Dana Baran, Andrea Herrera-Gayol, and Marcelo Cantarovich.** 2009. "Management of Chronic Allograft Nephropathy: A Systematic Review." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* : CJASN 4(4):860–65.
- Bleskestad, Inger Hjørdis, Inga Strand Thorsen, Grete Jonsson, Øyvind Skadberg, and Lasse Gunnar Gøransson.** 2017. "The Impact of Calcineurin Inhibitors on Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Fibroblast Growth Factor 23 in Long-Term Kidney Transplant Patients." *Clinical Transplantation* 31(8):e13015.
- Bolignano, Davide, Antonio Lacquaniti, Giuseppe Coppolino, Valentina Donato, Susanna Campo, Maria Rosaria Fazio, Giacomo Nicocia, and Michele Buemi.** 2009. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Progression of Chronic Kidney Disease." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* : CJASN 4(2):337–44.
- Bostom, Andrew G., Myra A. Carpenter, Lawrence Hunsicker, Paul F. Jacques, John W. Kusek, Andrew S. Levey, Joyce L. McKenney, Renee Y. Mercier, Marc A. Pfeffer, Jacob Selhub, and FAVORIT Study Investigators.** 2009. "Baseline Characteristics of Participants in the Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation (FAVORIT) Trial." *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 53(1):121–28.
- Bostom, Andrew G., Myra A. Carpenter, John W. Kusek, Lawrence G. Hunsicker, Marc A. Pfeffer, Andrew S. Levey, Paul F. Jacques, Joyce McKenney, and FAVORIT Investigators.** 2006. "Rationale and Design of the Folic Acid for Vascular Outcome Reduction In Transplantation (FAVORIT) Trial." *American Heart Journal* 152(3):448.e1-448.e7.
- Bostom, Andrew, Dominik Steubl, Pranav S. Garimella, Nora Franceschini, Mary B. Roberts, Andreas Pasch, Joachim H. Ix, Katherine R. Tuttle, Anastasia Ivanova, Theresa Shireman, S. Joseph Kim, Reginald Gohh, Daniel E. Weiner, Andrew S. Levey, Chiyuan Hsu, John W. Kusek, and Charles B. Eaton.** 2018. "Serum Uromodulin: A Biomarker of Long-Term Kidney Allograft Failure." *American Journal of Nephrology* 47(4):275–82.
- Cai, L., J. Rubin, W. Han, P. Venge, and S. Xu.** 2010. "The Origin of Multiple Molecular Forms in Urine of HNL/NGAL." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 5(12):2229–35.
- Cappuccilli, Maria, Irene Capelli, Giorgia Comai, Giuseppe Cianciolo, and Gaetano La**

- Manna.** 2018. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Biomarker of Allograft Function After Renal Transplantation: Evaluation of the Current Status and Future Insights." *Artificial Organs* 42(1):8–14.
- Chang, Chih-Hsiang, Chia-Hung Yang, Huang-Yu Yang, Tien-Hsing Chen, Chan-Yu Lin, Su-Wei Chang, Yi-Ting Chen, Cheng-Chieh Hung, Ji-Tseng Fang, Chih-Wei Yang, and Yung-Chang Chen.** 2015. "Urinary Biomarkers Improve the Diagnosis of Intrinsic Acute Kidney Injury in Coronary Care Units." *Medicine* 94(40):e1703.
- Choi, H. M., K. T. Park, J. W. Lee, E. Cho, S. K. Jo, W. Y. Cho, and H. K. Kim.** 2013. "Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Predicts Graft Outcome up to 1 Year After Kidney Transplantation." *Transplantation Proceedings* 45:122–28.
- Connolly, G. M., R. Cunningham, P. T. McNamee, I. S. Young, and A. P. Maxwell.** 2008. "Troponin T Is an Independent Predictor of Mortality in Renal Transplant Recipients." *Nephrology Dialysis Transplantation* 23(3):1019–25.
- Cowland, Jack B. and Niels Borregaard.** 1997. "Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans." *Genomics* 45(1):17–23.
- Dent, Catherine L., Qing Ma, Sudha Dastrala, Michael Bennett, Mark M. Mitsnefes, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan.** 2007. "Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Predicts Acute Kidney Injury, Morbidity and Mortality after Pediatric Cardiac Surgery: A Prospective Uncontrolled Cohort Study." *Critical Care* 11(6):R127.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation.** 2018a. "Niere - Warteliste Und Vermittlung." Retrieved February 24, 2019 (<https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/warteliste-und-vermittlung/niere.html>).
- Deutsche Stiftung Organtransplantation.** 2018b. "Nierentransplantation." Retrieved February 24, 2019 (<https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/nierentransplantation.html>).
- Deutsche Stiftung Organtransplantation.** 2018c. *Organspende Und Transplantation in Deutschland. Jahresbericht 2017.* Frankfurt / Main.
- Devine, Paul A., Aisling E. Courtney, and Alexander P. Maxwell.** 2018. "Cardiovascular Risk in Renal Transplant Recipients." *Journal of Nephrology*.
- Ebbing, Jan, Susanne Mathia, Felix S. Seibert, Nikolaos Pagonas, Frederic Bauer, Barbara Erber, Karsten Günzel, Ergin Kilic, Carsten Kempkensteffen, Kurt Miller, Alexander Bachmann, Christian Rosenberger, Walter Zidek, and Timm H. Westhoff.** 2014. "Urinary Calprotectin: A New Diagnostic Marker in Urothelial Carcinoma of the Bladder." *World Journal of Urology* 32(6):1485–92.
- Ebbing, Jan, Felix S. Seibert, Nikolaos Pagonas, Frederic Bauer, Kurt Miller, Carsten Kempkensteffen, Karsten Günzel, Alexander Bachmann, Hans H. Seifert, Cyrill A.**

- Rentsch, Peter Ardel, Christian Wetterauer, Patrizia Amico, Nina Babel, and Timm H. Westhoff.** 2016. "Dynamics of Urinary Calprotectin after Renal Ischaemia." *PLOS ONE* 11(1).
- El-Zoghby, Z. M., M. D. Stegall, D. J. Lager, W. K. Kremers, H. Amer, J. M. Gloor, and F. G. Cosio.** 2009. "Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss." *American Journal of Transplantation* 9(3):527–35.
- Flower, D. R., A. C. North, and C. E. Sansom.** 2000. "The Lipocalin Protein Family: Structural and Sequence Overview." *Biochimica et Biophysica Acta* 1482(1–2):9–24.
- Foell, D., H. Wittkowski, J. Roth, and Dirk Foell.** 2009. "Monitoring Disease Activity by Stool Analyses: From Occult Blood to Molecular Markers of Intestinal Inflammation and Damage." *Gut* 58(6).
- Fonseca, Isabel, José Carlos Oliveira, Manuela Almeida, Madalena Cruz, Anabela Malho, La Salette Martins, Leonídio Dias, Sofia Pedroso, Josefina Santos, Luísa Lobato, António Castro Henriques, and Denisa Mendonça.** 2013. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Kidney Transplantation Is an Early Marker of Graft Dysfunction and Is Associated with One-Year Renal Function." *Journal of Transplantation* 2013:650123.
- Foster, M. C., D. E. Weiner, A. G. Bostom, M. A. Carpenter, L. A. Inker, P. Jarolim, A. A. Joseph, J. W. Kusek, T. Pesavento, M. A. Pfeffer, M. Rao, S. D. Solomon, and A. S. Levey.** 2017. "Filtration Markers, Cardiovascular Disease, Mortality, and Kidney Outcomes in Stable Kidney Transplant Recipients: The FAVORIT Trial." *American Journal of Transplantation* 17(9):2390–99.
- Foucher, Yohann, Pascal Daguin, Ahmed Akl, Michèle Kessler, Marc Ladrière, Christophe Legendre, Henri Kreis, Lionel Rostaing, Nassim Kamar, Georges Mourad, Valérie Garrigue, François Bayle, Bruno H. de Ligny, Mathias Büchler, Carole Meier, Jean P. Daurès, Jean-Paul Souillou, and Magali Giral.** 2010. "A Clinical Scoring System Highly Predictive of Long-Term Kidney Graft Survival." *Kidney International* 78(12):1288–94.
- Frischmann, Sandra.** 2015. "Calprotectin Im Urin Zur Differenzierung Des Prä- Und Intrarenalen Akuten Nierenversagens." Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Fujiu, Katsuhito, Ichiro Manabe, and Ryoza Nagai.** 2011. "Renal Collecting Duct Epithelial Cells Regulate Inflammation in Tubulointerstitial Damage in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121(9):3425–41.
- Fuquay, Richard, Brandon Renner, Liudmila Kulik, James W. McCullough, Claudia Amura, Derek Strassheim, Roberta Pelanda, Raul Torres, and Joshua M. Thurman.** 2013. "Renal Ischemia-Reperfusion Injury Amplifies the Humoral Immune Response." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24(7):1063–72.
- de Geus, Hilde R. H., Jan Bakker, Emmanuel M. E. H. Lesaffre, and Jos L. M. L. le Noble.** 2011. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin at ICU Admission Predicts for Acute Kidney Injury in Adult Patients." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183(7):907–14.

- Goetz, D. H., S. T. Willie, R. S. Armen, T. Bratt, N. Borregaard, and R. K. Strong. 2000. "Ligand Preference Inferred from the Structure of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin." *Biochemistry* 39(8):1935–41.
- Goetz, David H., Margaret A. Holmes, Niels Borregaard, Martin E. Bluhm, Kenneth N. Raymond, and Roland K. Strong. 2002. "The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent That Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition." *Molecular Cell* 10(5):1033–43.
- Gómez, E. Gómez, J. P. Campos Hernández, F. J. Márquez López, J. Ruiz García, V. García Montemayor, F. Anglada Curado, M. Leva Vallejo, J. C. Regueiro López, M. D. Navarro Cabello, P. Aljama, and M. J. Requena Tapia. 2013. "Long-Term Allograft Survival After Kidney Transplantation." *Transplantation Proceedings* 45(10):3599–3602.
- Haase-Fielitz, Anja, Michael Haase, and Prasad Devarajan. 2014. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Biomarker of Acute Kidney Injury: A Critical Evaluation of Current Status." *Annals of Clinical Biochemistry* 51(3):335–51.
- Haase, Michael, Rinaldo Bellomo, Prasad Devarajan, Peter Schlattmann, Anja Haase-Fielitz, and NGAL Meta-analysis Investigator Group. 2009. "Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis." *American Journal of Kidney Diseases* 54(6):1012–24.
- Halimi, J. M., M. Buchler, A. Al-Najjar, I. Laouad, Valérie Chatelet, J. F. Marlière, H. Nivet, and Y. Lebranchu. 2007. "Urinary Albumin Excretion and the Risk of Graft Loss and Death in Proteinuric and Non-Proteinuric Renal Transplant Recipients." *American Journal of Transplantation* 7(3):618–25.
- Halimi, Jean-Michel, Inass Laouad, Matthias Buchler, Azmi Al-Najjar, Valerie Chatelet, Tarik Sqalli Houssaini, Hubert Nivet, and Yvon Lebranchu. 2005. "Early Low-Grade Proteinuria: Causes, Short-Term Evolution and Long-Term Consequences in Renal Transplantation." *American Journal of Transplantation* 5(9):2281–88.
- Hall, Isaac E., Steven G. Coca, Mark A. Perazella, Umo U. Eko, Randy L. Luciano, Patricia R. Peter, Won K. Han, and Chirag R. Parikh. 2011. "Risk of Poor Outcomes with Novel and Traditional Biomarkers at Clinical AKI Diagnosis." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6(12):2740–49.
- Halloran, P. F., A. Melk, and C. Barth. 1999. "Rethinking Chronic Allograft Nephropathy: The Concept of Accelerated Senescence." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10(1):167–81.
- Hammer, H. B., E. A. Haavardsholm, and T. K. Kvien. 2008. "Calprotectin (a Major Leucocyte Protein) Is Associated with the Levels of Anti-CCP and Rheumatoid Factor in a Longitudinal Study of Patients with Very Early Rheumatoid Arthritis." *Scandinavian Journal of Rheumatology* 37(3):179–82.
- Hansen, Young B. L., Anette Damgaard, and Jørgen H. Poulsen. 2014. "Evaluation of NGAL

- TestTM on Cobas 6000." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 74(1):20–26.
- Hariharan, Sundaram, Maureen A. McBride, Wida S. Cherikh, Christine B. Tolleris, Barbara A. Bresnahan, and Christopher P. Johnson.** 2002. "Post-Transplant Renal Function in the First Year Predicts Long-Term Kidney Transplant Survival." *Kidney International* 62:311–18.
- Heagerty, P. J., T. Lumley, and M. S. Pepe.** 2000. "Time-Dependent ROC Curves for Censored Survival Data and a Diagnostic Marker." *Biometrics* 56(2):337–44.
- Heller, Frank, Sandra Frischmann, Maria Grünbaum, Walter Zidek, and Timm H. Westhoff.** 2011. "Urinary Calprotectin and the Distinction between Prerenal and Intrinsic Acute Kidney Injury." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6(10):2347–55.
- Higgins, R. S. D. and J. A. Fishman.** 2006. "Disparities in Solid Organ Transplantation for Ethnic Minorities: Facts and Solutions." *American Journal of Transplantation* 6(11):2556–62.
- Hollmen, Maria E., Lauri E. Kyllönen, Kaija A. Inkinen, Martti L. T. Lalla, and Kaija T. Salmela.** 2011. "Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a Marker of Graft Recovery after Kidney Transplantation." *Kidney International* 79(1):89–98.
- Hvidberg, Vibeke, Christian Jacobsen, Roland K. Strong, Jack B. Cowland, Søren K. Moestrup, and Niels Borregaard.** 2005. "The Endocytic Receptor Megalin Binds the Iron Transporting Neutrophil-Gelatinase-Associated Lipocalin with High Affinity and Mediates Its Cellular Uptake." *FEBS Letters* 579(3):773–77.
- Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany.** 2019. "IDK® Calprotectin ELISA Arbeitsanleitung." Retrieved January 4, 2019 (www.immundiagnostik.com).
- Institut für Immunologie der Universität Heidelberg.** 2019. "Collaborative Transplant Study." Retrieved March 24, 2019 (<http://www.ctstransplant.org/>).
- IQTIG - Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen.** 2018. *Nierentransplantation Qualitätsindikatoren - Bundesauswertung Zum Erfassungsjahr 2017.*
- Ix, Joachim H., Ronit Katz, Nisha Bansal, Meredith Foster, Daniel E. Weiner, Russell Tracy, Vasantha Jotwani, Jan Hughes-Austin, Dianne McKay, Francis Gabbai, Chi-yuan Hsu, Andrew Bostom, Andrew S. Levey, and Michael G. Shlipak.** 2016. "Urine Fibrosis Markers and Risk of Allograft Failure in Kidney Transplant Recipients: A Case-Cohort Ancillary Study of the FAVORIT Trial." *American Journal of Kidney Diseases* 69(3):410–19.
- Jafari, A., M. R. Khatami, S. Dashti-Khavidaki, M. Lessan-Pezeshki, and A. Abdollahi.** 2017. "Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Marker for Prediction of 3-Month Graft Survival after Kidney Transplantation." *International Journal of Organ Transplantation Medicine* Vol. 8 (1):17–27.
- Kaboré, Rémi, Maria C. Haller, Jérôme Harambat, Georg Heinze, and Karen Leffondré.**

2017. "Risk Prediction Models for Graft Failure in Kidney Transplantation: A Systematic Review." *Nephrology Dialysis Transplantation* 32:ii68-ii76.
- Kadambi, Pradeep V, Daniel C. Brennan, and W. James Chon.** 2018. "Evaluation and Diagnosis of the Patient with Renal Allograft Dysfunction - UpToDate." *UpToDate*. Retrieved January 4, 2019 (<https://www.uptodate.com/contents/evaluation-and-diagnosis-of-the-patient-with-renal-allograft-dysfunction>).
- Kasiske, B. L., H. A. Chakkerla, and J. Roel.** 2000. "Explained and Unexplained Ischemic Heart Disease Risk after Renal Transplantation." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 11(9):1735–43.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group.** 2012. "KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury." *Kidney International Suppl.* 2(1):1–138.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group.** 2009. "KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients." *American Journal of Transplantation* 9:S1–155.
- Kjeldsen, L., J. B. Cowland, and N. Borregaard.** 2000. "Human Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Homologous Proteins in Rat and Mouse." *Biochimica et Biophysica Acta* 1482(1–2):272–83.
- Kjeldsen, L., A. H. Johnsen, H. Sengeløv, and N. Borregaard.** 1993. "Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase." *The Journal of Biological Chemistry* 268(14):10425–32.
- Kleinsteuber, A., F. Halleck, D. Khadzhyrov, A. Staack, L. Lehner, M. Duerr, P. Glander, D. Schmidt, K. Budde, and O. Staack.** 2018. "Impact of Pre-Existing Comorbidities on Long-Term Outcomes in Kidney Transplant Recipients." *Transplantation Proceedings* 50(10):3232–41.
- Koning, O. H., R. J. Ploeg, J. H. van Bockel, M. Groenewegen, F. J. van der Woude, G. G. Persijn, and J. Hermans.** 1997. "Risk Factors for Delayed Graft Function in Cadaveric Kidney Transplantation: A Prospective Study of Renal Function and Graft Survival after Preservation with University of Wisconsin Solution in Multi-Organ Donors. European Multicenter Study Group." *Transplantation* 63(11):1620–28.
- Koyner, Jay L., Amit X. Garg, Steven G. Coca, Kyaw Sint, Heather Thiessen-Philbrook, Uptal D. Patel, Michael G. Shlipak, Chirag R. Parikh, and TRIBE-AKI Consortium.** 2012. "Biomarkers Predict Progression of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 23(5):905–14.
- Kristinsson, J., A. Røseth, M. K. Fagerhol, E. Aadland, H. Schjønsby, O. P. Børner, N. Raknerud, and K. Nygaard.** 1998. "Fecal Calprotectin Concentration in Patients with Colorectal Carcinoma." *Diseases of the Colon and Rectum* 41(3):316–21.
- Kuhlmann, Ulrich, Joachim Böhler, Friedrich C. Luft, Mark Dominik Alscher, and Ulrich**

- Kunzendorf.** 2015. *Nephrologie : Pathophysiologie, Klinik, Nierenersatzverfahren.* Thieme.
- Kunutsor, Setor K., Jose Luis Flores-Guerrero, Lyanne M. Kieneker, Tom Nilsen, Clara Hidden, Erling Sundrehagen, Samuel Seidu, Robin P. F. Dullaart, and Stephan J. L. Bakker.** 2018. "Plasma Calprotectin and Risk of Cardiovascular Disease: Findings from the PREVENT Prospective Cohort Study." *Atherosclerosis* 275:205–13.
- Lacquaniti, Antonio, Chiara Caccamo, Paola Salis, Valeria Chirico, Antoine Buemi, Valeria Cernaro, Alberto Noto, Giuseppina Pettinato, Domenico Santoro, Tullio Bertani, Michele Buemi, and Antonio David.** 2016. "Delayed Graft Function and Chronic Allograft Nephropathy: Diagnostic and Prognostic Role of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin." *Biomarkers* 21(4):371–78.
- Lhotta, Karl.** 2018. "Akute Nierenschädigung." *ÖÄZ* 1/2:26–33.
- Liaño, F. and J. Pascual.** 1996. "Epidemiology of Acute Renal Failure: A Prospective, Multicenter, Community-Based Study. Madrid Acute Renal Failure Study Group." *Kidney International* 50(3):811–18.
- Lopes, José António and Sofia Jorge.** 2013. "The RIFLE and AKIN Classifications for Acute Kidney Injury: A Critical and Comprehensive Review." *Clinical Kidney Journal* 6(1):8–14.
- Maier, Herbert Thomas, Muhammad Imtiaz Ashraf, Christian Denecke, Sascha Weiss, Florian Augustin, Franka Messner, Natalie Vallant, Matthias Böcklein, Christian Margreiter, Georg Göbel, Johann Pratschke, Dietmar Öfner-Velano, and Felix Aigner.** 2018. "Prediction of Delayed Graft Function and Long-Term Graft Survival by Serum and Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin during the Early Postoperative Phase after Kidney Transplantation." *PLOS ONE* 13(1).
- Mange, K. C., B. Cizman, M. Joffe, and H. I. Feldman.** 2000. "Arterial Hypertension and Renal Allograft Survival." *JAMA* 283(5):633–38.
- Matsa, Ramprasad, Emma Ashley, Vivek Sharma, Andrew P. Walden, and Liza Keating.** 2014. "Plasma and Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the Diagnosis of New Onset Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients." *Critical Care* 18(4):R137.
- Mehta, Ravindra L., John A. Kellum, Sudhir V Shah, Bruce A. Molitoris, Claudio Ronco, David G. Warnock, Adeera Levin, and the Acute Kidney Injury Acute Kidney Injury Network.** 2007. "Acute Kidney Injury Network: Report of an Initiative to Improve Outcomes in Acute Kidney Injury." *Critical Care (London, England)* 11(2):R31.
- Meier-Kriesche, Herwig-Ulf, Jesse D. Schold, Titte R. Srinivas, and Bruce Kaplan.** 2004. "Lack of Improvement in Renal Allograft Survival despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates over the Most Recent Era." *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4(3):378–83.
- Mengel, M.** 2010. "Chronische Nierentransplantatschädigung." *Der Nephrologe* 5(4):307–13.
- Merion, Robert M., Valarie B. Ashby, Robert A. Wolfe, Dale A. Distant, Tempie E. Hulbert-**

- Shearon, Robert A. Metzger, Akinlolu O. Ojo, and Friedrich K. Port. 2005. "Deceased-Donor Characteristics and the Survival Benefit of Kidney Transplantation." *JAMA* 294(21):2726.
- Mishra, Jaya, Catherine Dent, Ridwan Tarabishi, Mark M. Mitsnefes, Qing Ma, Caitlin Kelly, Stacey M. Ruff, Kamyar Zahedi, Mingyuan Shao, Judy Bean, Kiyoshi Mori, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan. 2005. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker for Acute Renal Injury after Cardiac Surgery." *The Lancet* 365(9466):1231–38.
- Mishra, Jaya, Qing Ma, Caitlin Kelly, Mark Mitsnefes, Kiyoshi Mori, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan. 2006. "Kidney NGAL Is a Novel Early Marker of Acute Injury Following Transplantation." *Pediatric Nephrology* 21(6):856–63.
- Mishra, Jaya, Qing Ma, Anne Prada, Mark Mitsnefes, Kamyar Zahedi, Jun Yang, Jonathan Barasch, and Prasad Devarajan. 2003. "Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(10):2534–43.
- Molnar, Miklos Z., Danh V. Nguyen, Yanjun Chen, Vanessa Ravel, Elani Streja, Mahesh Krishnan, Csaba P. Kovesdy, Rajnish Mehrotra, and Kamyar Kalantar-Zadeh. 2017. "Predictive Score for Posttransplantation Outcomes." *Transplantation* 101(6):1353–64.
- Mori, Kiyoshi, H. Thomas Lee, Dana Rapoport, Ian R. Drexler, Kirk Foster, Jun Yang, Kai M. Schmidt-Ott, Xia Chen, Jau Yi Li, Stacey Weiss, Jaya Mishra, Faisal H. Cheema, Glenn Markowitz, Takayoshi Suganami, Kazutomo Sawai, Masashi Mukoyama, Cheryl Kunis, Vivette D'Agati, Prasad Devarajan, and Jonathan Barasch. 2005. "Endocytic Delivery of Lipocalin-Siderophore-Iron Complex Rescues the Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of Clinical Investigation* 115(3):610–21.
- Nagarajan, Mani, Sakthirajan Ramanathan, Jeyachandran Dhanapriya, Thanigachalam Dineshkumar, T. Bala Subramaniam, and Natarajan Gopalakrishnan. 2017. "Impact of Acute Kidney Injury on Renal Allograft Survival." *Renal Failure* 39(1):40–44.
- Naik, Abhijit S., Ankit Sakhuja, Diane M. Cibrik, Akinlolu O. Ojo, Milagros D. Samaniego-Picota, and Krista L. Lentine. 2016. "The Impact of Obesity on Allograft Failure After Kidney Transplantation." *Transplantation* 100(9):1963–69.
- Nauta, F. L., S. J. L. Bakker, W. Van Oeveren, G. Navis, J. J. H. Van Der Heide, H. Van Goor, P. E. De Jong, and R. T. Gansevoort. 2011. "Albuminuria, Proteinuria, and Novel Urine Biomarkers as Predictors of Long-Term Allograft Outcomes in Kidney Transplant Recipients." *YAJKD* 57(5):733–43.
- Nickolas, Thomas L., Matthew J. O'Rourke, Jun Yang, Meghan E. Sise, Pietro A. Canetta, Nicholas Barasch, Charles Buchen, Faris Khan, Kiyoshi Mori, James Giglio, Prasad Devarajan, and Jonathan Barasch. 2008. "Sensitivity and Specificity of a Single Emergency Department Measurement of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Diagnosing Acute Kidney Injury." *Annals of Internal Medicine* 148(11):810–19.

- Nickolas, Thomas L., Kai M. Schmidt-Ott, Pietro Canetta, Catherine Forster, Eugenia Singer, Meghan Sise, Antje Elger, Omar Maarouf, David Antonio Sola-Del Valle, Matthew O'Rourke, Evan Sherman, Peter Lee, Abdallah Geara, Philip Imus, Achuta Guddati, Allison Polland, Wasiq Rahman, Saban Elitok, Nasir Malik, James Giglio, Suzanne El-Sayegh, Prasad Devarajan, Sudarshan Hebbar, Subodh J. Saggi, Barry Hahn, Ralph Kettritz, Friedrich C. Luft, and Jonathan Barasch. 2012. "Diagnostic and Prognostic Stratification in the Emergency Department Using Urinary Biomarkers of Nephron Damage: A Multicenter Prospective Cohort Study." *Journal of the American College of Cardiology* 59(3):246–55.
- Nielsen, B. S., N. Borregaard, J. R. Bundgaard, S. Timshel, M. Sehested, and L. Kjeldsen. 1996. "Induction of NGAL Synthesis in Epithelial Cells of Human Colorectal Neoplasia and Inflammatory Bowel Diseases." *Gut* 38(3):414–20.
- Noordzij, Marlies, Karen Leffondré, Karlijn J. van Stralen, Carmine Zoccali, Friedo W. Dekker, and Kitty J. Jager. 2013. "When Do We Need Competing Risks Methods for Survival Analysis in Nephrology?" *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28(11):2670–77.
- Nordal, Hilde Haugedal, Magne K. Fagerhol, Anne-Kristine Halse, and Hilde Berner Hammer. 2017. "Calprotectin (S100A8/A9) Should Preferably Be Measured in EDTA-Plasma; Results from a Longitudinal Study of Patients with Rheumatoid Arthritis." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 78(1–2):102–8.
- Parikh, C. R., S. G. Coca, H. Thiessen-Philbrook, M. G. Shlipak, J. L. Koyner, Z. Wang, C. L. Edelstein, P. Devarajan, U. D. Patel, M. Zappitelli, C. D. Krawczeski, C. S. Passik, M. Swaminathan, A. X. Garg, and TRIBE-AKI Consortium. 2011. "Postoperative Biomarkers Predict Acute Kidney Injury and Poor Outcomes after Adult Cardiac Surgery." *Journal of the American Society of Nephrology* 22(9):1748–57.
- Parikh, C. R., A. Jani, J. Mishra, Q. Ma, C. Kelly, J. Barasch, C. L. Edelstein, and P. Devarajan. 2006. "Urine NGAL and IL-18 Are Predictive Biomarkers for Delayed Graft Function Following Kidney Transplantation." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6(7):1639–45.
- Perico, Norberto, Dario Cattaneo, Mohamed H. Sayegh, and Giuseppe Remuzzi. 2004. "Delayed Graft Function in Kidney Transplantation." *The Lancet* 364(9447):1814–27.
- Perry, Tjörvi E., Jochen D. Muehlschlegel, Kuang-Yu Liu, Amanda A. Fox, Charles D. Collard, Stanton K. Shernan, Simon C. Body, and CABG Genomics Investigators. 2010. "Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Acute Postoperative Kidney Injury in Adult Cardiac Surgical Patients." *Anesthesia and Analgesia* 110(6):1541–47.
- Pezeshgi, Aiyoub, Sima Abedi Azar, Hussein Ghasemi, Koorosh Kamali, Abdolreza Esmaeilzadeh, Bahare Hajsalimi, Sajad Pour-Asghar, Mohammad Reza Behmanesh, and Mina Kiafar. 2016. "Role of Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as

- an Emerging Biomarker of Acute Renal Failure Following Kidney Transplantation and Its Correlation with Plasma Creatinine." *Journal of Renal Injury Prevention* 5(2):98–103.
- Pippias, Maria, Anneke Kramer, Aragon Renal Registry, et al.** 2017. "The European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association Registry Annual Report 2014: A Summary." *Clinical Kidney Journal* 1–16.
- Ramírez-Sandoval, Juan C., Jonatan Barrera-Chimal, Perla E. Simancas, Alejandro Rojas-Montaño, Ricardo Correa-Rotter, Norma A. Bobadilla, and Luis E. Morales-Buenrostro.** 2014. "Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Predicts Graft Loss after Acute Kidney Injury in Kidney Transplant." *Biomarkers* 19(1):63–69.
- Ramirez-Sandoval, Juan C., William Herrington, and Luis E. Morales-Buenrostro.** 2015. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Kidney Transplantation: A Review." *Transplantation Reviews* 29(3):139–44.
- Riella, Leonardo V., Arjang Djamali, and Julio Pascual.** 2016. "Chronic Allograft Injury: Mechanisms and Potential Treatment Targets." *Transplantation Reviews*.
- Ronco, Claudio, Matthieu Legrand, Stuart L. Goldstein, Mina Hur, Nam Tran, Eric C. Howell, Vincenzo Cantaluppi, Dinna N. Cruz, Kevin Damman, Sean M. Bagshaw, Salvatore Di Somma, and Andrew Lewington.** 2014. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: Ready for Routine Clinical Use? An International Perspective." *Blood Purification* 37(4):271–85.
- Rubin, Donald B., ed.** 1987. *Multiple Imputation for Nonresponse in Surveys*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Salvadori, Maurizio, Alberto Rosati, Andreas Bock, Jeremy Chapman, Bertrand Dussol, Lutz Fritsche, Volker Kliem, Yvon Lebranchu, Federico Oppenheimer, Erich Pohanka, Gunnar Tufveson, and Elisabetta Bertoni.** 2006. "Estimated One-Year Glomerular Filtration Rate Is the Best Predictor of Long-Term Graft Function Following Renal Transplant." *Transplantation* 81(2):202–6.
- Sawinski, D., J. Trofe-Clark, B. Leas, S. Uhl, S. Tuteja, J. L. Kaczmarek, B. French, and C. A. Umscheid.** 2016. "Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis." *American Journal of Transplantation* 16(7):2117–38.
- Schaub, S., P. Nickerson, D. Rush, M. Mayr, C. Hess, M. Golian, W. Stefura, and K. HayGlass.** 2009. "Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels Correlate with the Extent of Subclinical Tubulitis." *American Journal of Transplantation* 9(6):1347–53.
- Schmidt-Ott, K. M.** 2011. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Biomarker of Acute Kidney Injury--Where Do We Stand Today?" *Nephrology Dialysis Transplantation* 26(3):762–64.
- Schmidt-Ott, K. M., K. Mori, J. Y. Li, A. Kalandadze, D. J. Cohen, P. Devarajan, and J. Barasch.** 2007. "Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin." *Journal of*

- the American Society of Nephrology* 18(2):407–13.
- Schrezenmeier, E. V, J. Barasch, K. Budde, T. Westhoff, and K. M. Schmidt-Ott.** 2017. "Biomarkers in Acute Kidney Injury - Pathophysiological Basis and Clinical Performance." *Acta Physiologica (Oxford, England)* 219(3):554–72.
- Seibert, F. S., N. Pagonas, R. Arndt, F. Heller, D. Dragun, P. Persson, K. Schmidt-Ott, W. Zidek, and T. H. Westhoff.** 2013. "Calprotectin and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the Differentiation of Pre-Renal and Intrinsic Acute Kidney Injury." *Acta Physiologica* 207(4):700–708.
- Seibert, Felix S., Christian Rosenberger, Susanne Mathia, Robert Arndt, Wolfgang Arns, Huppertz Andrea, Nikolaos Pagonas, Frederic Bauer, Walter Zidek, and Timm H. Westhoff.** 2017. "Urinary Calprotectin Differentiates Between Prerenal and Intrinsic Acute Renal Allograft Failure." *Transplantation* 101(2):387–94.
- Seibert, Felix S., Maximilian Sitz, Jürgen Passfall, Martin Haesner, Peter Laschinski, Martin Buhl, Frederic Bauer, Nina Babel, Nikolaos Pagonas, and Timm H. Westhoff.** 2018. "Prognostic Value of Urinary Calprotectin, NGAL and KIM-1 in Chronic Kidney Disease." *Kidney and Blood Pressure Research* 43(4):1255–62.
- Serón, Daniel, Wolfgang Arns, and Jeremy R. Chapman.** 2008. "Chronic Allograft Nephropathy--Clinical Guidance for Early Detection and Early Intervention Strategies." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23(8):2467–73.
- Singer, E., L. Markó, N. Paragas, J. Barasch, D. Dragun, D. N. Müller, K. Budde, and K. M. Schmidt-Ott.** 2013. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: Pathophysiology and Clinical Applications." *Acta Physiologica (Oxford, England)* 207(4):663–72.
- Singer, Eugenia.** 2013. "Neutrophilen-Gelatinase-Assoziiertes Lipokalin (NGAL) Als Biomarker Zur Differenzialdiagnose Und Prognoseabschätzung Bei Akutem Nierenversagen." Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Singer, Eugenia, Antje Elger, Saban Elitok, Ralph Kettritz, Thomas L. Nickolas, Jonathan Barasch, Friedrich C. Luft, and Kai M. Schmidt-Ott.** 2011. "Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Distinguishes Pre-Renal from Intrinsic Renal Failure and Predicts Outcomes." *Kidney International* 80(4):405–14.
- Singer, Eugenia, Eva V Schrezenmeier, Antje Elger, Evelyn R. Seelow, Alexander Krannich, Friedrich C. Luft, and Kai M. Schmidt-ott.** 2016. "Urinary NGAL-Positive Acute Kidney Injury and Poor Long-Term Outcomes in Hospitalized Patients." *Kidney International Reports* 1(3):114–24.
- Solez, K., R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, I. W. Gibson, P. C. Grimm, M. Haas, E. Lerut, H. Liapis, R. B. Mannon, P. B. Marcus, M. Mengel, M. J. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickeleit, J. C. Papadimitriou, J. L. Platt, P. Randhawa, I. Roberts, L. Salinas-Madruga, D. R. Salomon, D. Seron, M. Sheaff, and J. J. Weening.** 2007. "Banff

- '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN')." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7(3):518–26.
- Soveri, Inga, Ingar Holme, Hallvard Holdaas, Klemens Budde, Alan G. Jardine, and Bengt Fellström.** 2012. "A Cardiovascular Risk Calculator for Renal Transplant Recipients." *Transplantation Journal* 94(1):57–62.
- Soveri, Inga, Jon Snyder, Hallvard Holdaas, Ingar Holme, Alan G. Jardine, Gilbert J. L'Italien, and Bengt Fellström.** 2013. "The External Validation of the Cardiovascular Risk Equation for Renal Transplant Recipients." *Transplantation Journal* 95(1):142–47.
- Stallone, Giovanni, Barbara Infante, Antonio Schena, Michele Battaglia, Pasquale Ditunno, Antonia Loverre, Loreto Gesualdo, Francesco Paolo Schena, and Giuseppe Grandaliano.** 2005. "Rapamycin for Treatment of Chronic Allograft Nephropathy in Renal Transplant Patients." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 16(12):3755–62.
- Stríz, I. and I. Trebichavský.** 2004. "Calprotectin - a Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation." *Physiological Research* 53(3):245–53.
- Susantitaphong, P., D. N. Cruz, J. Cerda, M. Abulfaraj, F. Alqahtani, I. Koulouridis, B. L. Jaber, and Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology.** 2013. "World Incidence of AKI: A Meta-Analysis." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 8(9):1482–93.
- Tepel, Martin, Christoffer Borst, Claus Bistrup, Niels Marcussen, Nikolaos Pagonas, Felix S. Seibert, Robert Arndt, Walter Zidek, and Timm H. Westhoff.** 2014. "Urinary Calprotectin and Posttransplant Renal Allograft Injury." *PLOS ONE* 9(11).
- Tong, Junrong, Hong Li, Hong Zhang, Zhengmao Luo, Yuanhang Huang, Jun Huang, Feng He, and Junzhou Fu.** 2015. "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the Prediction of Contrast-Induced Nephropathy." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 66(3):239–45.
- Uchino, Shigehiko, John A. Kellum, Rinaldo Bellomo, Gordon S. Doig, Hiroshi Morimatsu, Stanislao Morgera, Miet Schetz, Ian Tan, Catherine Bouman, Ettiene Macedo, Noel Gibney, Ashita Tolwani, Claudio Ronco, and Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators.** 2005. "Acute Renal Failure in Critically Ill Patients: A Multinational, Multicenter Study." *JAMA* 294(7):813–18.
- Vella, John.** 2018. "Risk Factors for Graft Failure in Kidney Transplantation - UpToDate." *UpToDate*. Retrieved December 29, 2018 (<https://www.uptodate.com/contents/risk-factors-for-graft-failure-in-kidney-transplantation#!>).
- Wagener, Gebhard, Michael Jan, Mihwa Kim, Kiyoshi Mori, Jonathan M. Barasch, Robert N. Sladen, and H. Thomas Lee.** 2006. "Association between Increases in Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Acute Renal Dysfunction after Adult Cardiac Surgery." *Anesthesiology* 105(3):485–91.

- Weiner, D. E., M. A. Carpenter, A. S. Levey, A. Ivanova, E. H. Cole, L. Hunsicker, B. L. Kasiske, S. J. Kim, J. W. Kusek, and A. G. Bostom. 2012. "Kidney Function and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality in Kidney Transplant Recipients: The FAVORIT Trial." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12(9):2437–45.
- Weiner, Daniel E., Meyeon Park, Hocine Tighiouart, Alin A. Joseph, Myra A. Carpenter, Nitender Goyal, Andrew A. House, Chi-Yuan Hsu, Joachim H. Ix, Paul F. Jacques, Clifton E. Kew, S. Joseph Kim, John W. Kusek, Todd E. Pesavento, Marc A. Pfeffer, Stephen R. Smith, Matthew R. Weir, Andrew S. Levey, and Andrew G. Bostom. 2019. "Albuminuria and Allograft Failure, Cardiovascular Disease Events, and All-Cause Death in Stable Kidney Transplant Recipients: A Cohort Analysis of the FAVORIT Trial." *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 73(1):51–61.
- Westhoff, Jens H., Alexander Fichtner, Sina Waldherr, Nikolaos Pagonas, Felix S. Seibert, Nina Babel, Burkhard Tönshoff, Frederic Bauer, and Timm H. Westhoff. 2016. "Urinary Biomarkers for the Differentiation of Prerenal and Intrinsic Pediatric Acute Kidney Injury." *Pediatric Nephrology* 31(12):2353–63.
- Wu, Christine, Idris Evans, Raymond Joseph, Ron Shapiro, Henkie Tan, Amit Basu, Cynthia Smetanka, Ahktar Khan, Jerry McCauley, and Mark Unruh. 2005. "Comorbid Conditions in Kidney Transplantation: Association with Graft and Patient Survival." *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(8):2132–41.
- Xu, S. Y., K. Pauksen, and P. Venge. 1995. "Serum Measurements of Human Neutrophil Lipocalin (HNL) Discriminate between Acute Bacterial and Viral Infections." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 55(2):125–31.
- Youden, W. J. 1950. "Index for Rating Diagnostic Tests." *Cancer* 3(1):32–35.
- Zhang, An, Ying Cai, Peng-Fei Wang, Jian-Ning Qu, Zhen-Chun Luo, Xiao-Dong Chen, Bin Huang, Yi Liu, Wen-Qi Huang, Jing Wu, and Yue-Hui Yin. 2016. "Diagnosis and Prognosis of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Acute Kidney Injury with Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Critical Care* 20(1):41.
- Zhou, Fangfang, Qun Luo, Lailiang Wang, and Lina Han. 2016. "Diagnostic Value of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Early Diagnosis of Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 49(3):746–55.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Ricarda Merle Hinz, geborene Viol, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation der Wertigkeit nicht-invasiver Biomarker der Nephronschädigung zur langfristigen Prognoseabschätzung nach Nierentransplantation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten werden von mir verantwortet.

Ich besitze keine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation. Aus dieser Dissertation sind bisher keine Publikationen hervorgegangen. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

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

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Kai M. Schmidt-Ott danke ich für das interessante Promotionsthema und für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung während der Durchführung der Studie, der Auswertung der Daten und dem Verfassen der Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Timm H. Westhoff sage ich Danke, dass er uns die Calprotectin-Messungen ermöglicht hat.

Bei Prof. Dr. med. Klemens Budde bedanke ich mich für die hilfreiche Motivation sowie die sachkundigen und erfahrenen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. med. K.-U. Eckardt danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik zu promovieren.

Ferner danke ich Dr. med. Eugenia Singer für die Einarbeitung in das Thema und die tatkräftige Unterstützung in der Studiendurchführung und Datenerhebung.

Frau MPH Pimrapat Gebert bin ich für die Beratung zur Datenanalyse und Hilfestellungen bei den statistischen Auswertungen zu Dank verpflichtet.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Martin Obermeier und MTA Frau Geisler sowie Studienassistentin Simone Voigt für die große Hilfsbereitschaft und Geduld bei den unzähligen Messungen der Studienproben Danke sagen. Nicht zu vergessen: Ein großes Dankeschön gilt dem Ambulanzteam der Nephrologie Charité Mitte mit seinem unermüdlichen Einsatz bei der Patientenrekrutierung und Probensammlung.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Doktorkolleginnen Carolin Markus und Jutta Swolinsky für den unentwegten Fleiß und die besonders hervorzuhebende kooperative Zusammenarbeit.

Mein größter Dank geht an meine Eltern Karin und Fritz, an meine Frau Katrin, an meinen Bruder Yannick und an meine gesamte Familie mit Freunden, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt, ermutigt und in manchen Augenblicken auch ertragen haben. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.