

Aus der Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipokalin (NGAL) als Biomarker zur
Differenzialdiagnose und Prognoseabschätzung bei akutem Nierenversagen.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eugenia Singer
aus Swerdlowsk (Jekaterinburg), Russland

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. K. Schmidt-Ott
 2. Prof. Dr. med. S. Morgera
 3. Prof. Dr. med. M. Kuhlmann

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Akutes Nierenversagen	1
1.2 Diagnostik des akuten Nierenversagen	1
1.3 Klassifikationen des akuten Nierenversagens	2
1.4. Ursachen des akuten Nierenversagens	4
1.5 Prognose bei akutem Nierenversagen	7
1.6. Biomarker des akuten Nierenversagens	7
1.7. Neutrophilen Gelatinase – assoziiertes Lipokalin (NGAL)	8
1.8. NGAL in Tiermodellen	9
1.9 NGAL in klinischen Studien	10
2. Zielstellung	12
3. Methoden und Material	12
3.1. Material	12
3.1.1 Geräte	12
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	13
3.1.3. Medien, Reagenzien, Antikörper	13
3.1.4. Puffer und Lösungen	14
3.2 Methoden	14
3.2.1. Zuverlässigkeit eines kommerziellen Messverfahrens	14
3.2.2 Klinische Studie	18
3.2.3 Statistik	19
4. Ergebnisse	21
4.1 Vergleich zwischen beiden Bestimmungsmethoden	21
4.2. Ergebnisse der klinischen Studie	23
4.2.1 Differenzialdiagnose zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen	24
4.2.2 Differenzialdiagnose mittels herkömmlicher Parameter am ersten Tag	28
4.2.3 Differenzialdiagnose zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen mittels uNGAL am ersten Tag	28
4.2.4 Prognose	29
4.2.5a Prognose (kombinierter Endpunkt: RIFLE-Stufe-Erhöhung, Dialyse, Tod) mittels herkömmlicher Parameter am ersten Tag	32
4.2.5b Prognose (kombinierter Endpunkt: RIFLE-Stufe-Erhöhung, Dialyse, Tod) mittels uNGAL am ersten Tag	33
4.2.7 Prognose mittels serieller uNGAL-Bestimmung	33
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	42
Literatur	44
Lebenslauf	50
Publikationsliste	51
Selbständigkeitserklärung	52
Danksagung	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 RIFLE- und AKIN-Klassifikation.....	3
Abbildung 2 Western Blot zum Nachweis von monomerem uNGAL.....	18
Abbildung 3 Korrelation zwischen uNGAL gemessen mit Architect-Plattform und mit Western Blot.....	22
Abbildung 4 ROC-Kurven für 5 Urinbiomarker für die Detektion von akutem intrinsisch renalem Nierenversagen	23
Abbildung 5 Patientenklassifizierung.....	25
Abbildung 6 uNGAL, Serum Kreatinin und uNGAL/uKreatinin Ratio zur Differenzierung zwischen prärenalem und intrinsisch renalem akutem Nierenversagen.....	27
Abbildung 7 uNGAL, Serum Kreatinin und uNGAL/uKreatinin Ratio zur Prognoseabschätzung bei akutem Nierenversagen	32
Abbildung 8 uNGAL und Endpunkte.....	33
Abbildung 9 Modelle der multiplen logistischen Regression für die Prädiktion ungünstiger klinischer Verläufe.....	36
Abbildung 10 Patientenstratifizierung nach RIFLE-Stufen und NGAL.....	37
Abbildung 11 Modelle der multiplen logistischen Regression für die Prädiktion eines protrahierten Nierenversagens	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Geräte.....	12
Tabelle 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 3 Verwendete Medien, Reagenzien, Antikörper.....	13
Tabelle 4 Verwendete Puffer und Lösungen.....	14
Tabelle 5 Demographische Daten und Komorbiditäten.....	24
Tabelle 6 Nierenparameter bei Einschluss.....	26
Tabelle 7 Treffsicherheit von herkömmlichen Parametern (AUC-ROC).....	28
Tabelle 8 Test Charakteristika von Biomarkern zur Differenzierung zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen bei unterschiedlichen Cut-Offs.....	29
Tabelle 9 Klinischer Verlauf nach Einschluss.....	31
Tabelle 10a Entwicklung der Nierenparameter nach Einschluss.....	34
Tabelle 10b Entwicklung der Nierenparameter nach Einschluss.....	34
Tabelle 11 Endpunkte nach Einschluss.....	35

1. Einleitung

1.1. Akutes Nierenversagen

Das akute Nierenversagen, also eine rasche Verschlechterung der Nierenfunktion gemessen an Anstiegen von Retentionsparametern bzw. Verminderungen der Urinausscheidung (¹), ist häufig und von großer klinischer Bedeutung. Bei hospitalisierten Patienten beträgt die Inzidenz von akutem Nierenversagen über 7%. Knapp 20% der hospitalisierten Patienten mit akutem Nierenversagen versterben, bei einem Serum-Kreatinin über 3,0 mg/dL sogar 38% (²). In der BEST- Studie an mehr als 29000 Patienten auf Intensivstationen wurde ein akutes Nierenversagen bei 5,7% der Patienten nachgewiesen. Die Mortalität lag bei 60,3%. 13,5% der Überlebenden blieben bei der Entlassung dialyseabhängig (³).

1.2 Diagnostik des akuten Nierenversagen

Rehberg stellte zu Beginn des zwanzigsten Jahrhundert den Zusammenhang zwischen Serum-Kreatinin und Nierenfunktion her (⁴, ⁵). Seither wird das akute Nierenversagen durch serielle Kreatinin- Bestimmungen diagnostiziert. Die Nachweismethode basiert noch immer auf Modifikationen der Reaktion nach Jaffe aus dem neunzehnten Jahrhundert (⁶). Weil das Vorgehen für die Jaffe-Reaktion nie standardisiert wurde, sind die Messergebnisse laborabhängig.

Die tubuläre Sekretion von Kreatinin wird bei der Messung nicht berücksichtigt, so dass es zu einer Überschätzung der Nierenfunktion kommt. Andererseits erfasst die Messmethode nicht nur Kreatinin, so dass es – insbesondere seit Einführung der automatischen Messmethode – zum sogenannten Proteinfehler kommt. Dabei erhöht ein pseudochromogener Effekt von Plasmaproteinen die scheinbaren Kreatininwerte um bis zu 0,3 mg/dL bzw. 27 $\mu\text{mol/L}$ (⁷). Dadurch kommt es zu einer Unschärfe in der Korrelation zwischen berechneter glomerulärer Filtrationsrate und tatsächlicher Nierenfunktion, trotz der üblichen mathematischen Korrektur.

Wiederholte Bestimmungen sind notwendig, um ein akutes Nierenversagen zu erfassen, denn Kreatinin ist kein direkter Marker einer Nierenschädigung. Einzelne Kreatinin - Messungen unterscheiden nicht zwischen einer akuten und chronischen

Nierenfunktionsverschlechterung, so dass eine Diagnose ohne Kenntnis früherer Werte, z.B. in der Rettungsstelle nicht möglich ist.

Bei einer akuten Veränderung der Nierenfunktion ist Kreatinin ein retrospektiver und unzuverlässiger Parameter (^{8, 9}):

Aufgrund von Reservemöglichkeiten der Niere tritt ein relevanter Anstieg erst dann auf, wenn ein großer Teil der Nierenfunktion ausgefallen ist. Etwas kleinere Schäden bleiben unbemerkt. So geht ein wichtiger Teil der Information verloren, denn bereits geringe Nierenschädigungen sind mit einer höheren Mortalität und Verlängerung des stationären Aufenthalts assoziiert (¹⁰).

Kreatinin akkumuliert auch bei weitgehendem Ausfall der Nierenfunktion nur allmählich. So wurde in einer Studie zum akuten Nierenversagen nach kardialer Bypass-Operation der relevante Kreatinin- Anstieg (auf das anderthalbfache) erst 2-3 Tage postoperativ festgestellt (¹¹). Dies verzögert den Therapie-Beginn und verlängert den stationären Aufenthalt.

Erschwerend kommt hinzu, dass der Ausgangswert individuell unterschiedlich ist. Es ist unter anderem von Muskelmasse und Ernährung abhängig (¹²).

Bei Patienten mit einem schweren dialysepflichtigen Nierenversagen wird Kreatinin durch Dialyse entfernt und ist dann als Verlaufsparemeter nicht geeignet. Deswegen ist die Beendigung der Nierenersatztherapie eine subjektive Entscheidung. Eine frühzeitige Pausierung der Dialyse kann zu lebensbedrohlichen Komplikationen, wie Volumenüberladung mit Lungenödem oder schwerwiegende Herzrhythmusstörungen bei Hyperkaliämie führen. In der Routinediagnostik existiert kein Laborwert, der zuverlässig die Erholung der Nierenfunktion feststellen kann und somit bei der Entscheidung über Beendigung der Nierenersatztherapie hilfreich ist.

1.3 Klassifikationen des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen wird nach der RIFLE-Klassifikation unterteilt. Diese Klassifikation beruht auf seriellen Kreatinin-Messungen, Berechnung der glomerulären

Filtrationsrate und der Urinausscheidung (^{1, 13}). Wie in der Abbildung 1 gezeigt, umfasst die RIFLE- Klassifikation drei Stadien des akuten Nierenversagens: „Risk“-Risiko für eine renale Dysfunktion, „Injury“-renale Schädigung und „Failure“-Verlust der Nierenfunktion. Es werden auch zwei klinische Endpunkte erfasst: „Loss“-persistierendes Nierenversagen: Notwendigkeit der Nierenersatztherapie von über vier Wochen und „End Stage Kidney Disease“- terminale Niereninsuffizienz: Notwendigkeit der Nierenersatztherapie über 3 Monate oder mehr.

Nach der Einführung der RIFLE- Klassifikation wurde in mehreren Studien (^{14, 15, 16, 17, 18}) festgestellt, dass bereits Patienten mit einem geringen Kreatinin-Anstieg eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit stabilen Kreatinin- Werten. Deswegen wurde als Modifikation die AKIN- Klassifikation (Abbildung 1) etabliert (Mehta RL et al 2007 (¹)).

RIFLE Stufen		AKIN Stadium		RIFLE und AKIN
	Kreatinin /GFR-Kriterium		Kreatinin /GFR-Kriterium	Urin-Ausscheidung
R	Kreatinin-Anstieg $\geq 50\%$ oder GFR-Abfall $\geq 25\%$	I	Kreatinin-Anstieg $\geq 50\%$ oder $\geq 0,3$ mg/dl	<als 0.5 ml/kg für >als 6 Stunden
I	Kreatinin-Anstieg $\geq 100\%$ oder GFR-Abfall $\geq 50\%$	II	Kreatinin-Anstieg $\geq 100\%$	<als 0.5 ml/kg für >als 12 Stunden
F	Kreatinin-Anstieg $\geq 200\%$ oder GFR-Abfall $\geq 75\%$ oder Kreatinin ≥ 4 mg/dl mit Anstieg von $\geq 0,5$ mg/dl	III	Kreatinin-Anstieg $\geq 200\%$ oder Kreatinin ≥ 4 mg/dl mit Anstieg von $\geq 0,5$ mg/dl oder Nierenersatztherapie	<als 0.3 ml/kg für >als 24 Stunden oder Anurie für 12 Stunden
L	Nierenersatztherapie ≥ 4 Wochen			
E	Nierenersatztherapie ≥ 3 Monate			

Abbildung 1: RIFLE- und AKIN-Klassifikation. Modifiziert nach Bellomo et al 2004 (¹³) und Mehta RL et al 2007 (¹). RIFLE: R-Risk, I-Injury, F-Failure, L-Loss, E-end stage renal disease. AKIN-Acute Kidney Injury Network, GFR-glomeruläre Filtrationsrate.

1.4. Ursachen des akuten Nierenversagens

Es gibt aus pathophysiologischer Sicht drei Ursachen für ein akutes Nierenversagen:

1. Prärenales Nierenversagen
2. Intrarenales Nierenversagen (bzw. Intrinsisch renales Nierenversagen)
3. Postrenales Nierenversagen

1. Zum prärenalen Nierenversagen kommt es bei Verschlechterung der renalen Perfusion. Ursächlich spielt ein echter Volumenmangel eine Rolle, z.B. bei gastrointestinalen Verlusten (Erbrechen, Durchfall), relevanten Blutungen, diuretischer Therapie. Außerdem kann ein relativer Volumenmangel zu einem prärenalen Nierenversagen führen, z.B. bei Hypotonie, dekompensierter Herz- oder Leberinsuffizienz. In der epidemiologischen „Madrid-Studie“⁽¹⁹⁾ war eine prärenale Ursache bei 21% der Patienten für akutes Nierenversagen verantwortlich.

Beim prärenalen Nierenversagen wird die Struktur der Niere nicht geschädigt. Unter Volumentherapie oder Verbesserung der Herz- oder Leberinsuffizienz normalisieren sich Retentionswerte innerhalb von wenigen Tagen⁽²⁰⁾.

2. Ein intrarenales Nierenversagen kann z.B. durch eine prolongierte Mangel durchblutung der Niere bei z.B. längerem Blutdruckabfall, Sepsis, Operationen hervorgerufen werden. In diesem Fall entsteht eine akute Tubulusnekrose. Akutes Nierenversagen kann auch bei Schädigung durch nephrotoxische Substanzen auftreten. Auch Autoimmunerkrankungen wie Glomerulonephritis oder Vaskulitiden können ein renales Nierenversagen hervorrufen. In der erwähnten Madrid-Studie⁽¹⁹⁾ war akute Tubulusnekrose die häufigste Ursache für akutes Nierenversagen (45%).

Bei einem akuten renalen Nierenversagen kommt es zu morphologischen Schäden im Nierengewebe. Diese Form des Nierenversagens kann durch Volumengabe nicht unmittelbar behoben werden.

3. Ein postrenales Nierenversagen entsteht bei Abflussbehinderung in den ableitenden Harnwegen. Ein postrenales Nierenversagen kann aufgrund von Steinen, Tumoren,

Harnblasentamponade oder Prostatahyperplasie auftreten. Postrenale Abflussbehinderungen können einseitig oder beidseitig sein.

In der Madrid-Studie (¹⁹) betrug die Häufigkeit des postrenalen Nierenversagens 10%.

Das postrenale Nierenversagen kann bildgebend, z.B. sonographisch festgestellt werden und ist nach der Beseitigung der Abflussbehinderung schnell reversibel.

In Gegensatz dazu ist es sehr schwierig und häufig nur retrospektiv möglich ein intrarenales Nierenversagen von einem prärenalem zu unterscheiden. Zur Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens werden daher traditionell verschiedene Parameter benutzt:

1. Miller et al fanden 1978 (²¹), dass eine Urinosmolarität über 500 mosm/kg/H₂O für ein prärenales Nierenversagen spricht, eine Urinosmolarität unter 350 mosm/kg/H₂O dagegen für ein renales Nierenversagen. Anhand der Urinosmolalität konnte in der Studie von Espinel (²²) bei 46 von 86 Patienten richtig zwischen prärenalem und renalem Nierenversagen differenziert werden.

2. Nach Espinel et al, 1980 (²²) kann mittels der „Fraktionellen Natrium-Exkretion“ zu nahezu 100% korrekt zwischen beiden Ursachen des akuten Nierenversagens unterschieden werden.

Die „Fraktionelle Natrium-Exkretion“ (FeNa) zeigt den Anteil an filtriertem Natrium, der in den Urin ausgeschieden wird (²³). Die Fraktionelle Natrium-Ausscheidung wird folgendermaßen berechnet:

(Natrium im Urin x Kreatinin im Serum)x100

Natrium im Serum x Kreatinin im Urin

Eine FeNa < 1% spricht für prärenales Nierenversagen (mit Natrium- und Volumenretention); eine FeNa >2% - für ein intrarenales Nierenversagen (mit verminderter Konzentrationsfähigkeit der Niere). Die fraktionelle Natrium-Ausscheidung hat einige Einschränkungen: Zum Beispiel bleibt sie niedrig bei Patienten mit akuter Tubulusnekrose aufgrund fortgeschrittener Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose (²⁴);

unter diuretischer Therapie bleibt der Wert falsch hoch infolge Diuretika- induzierter Natriurese.

3. Die fraktionelle Harnstoff Ausscheidung zeigt den Anteil an filtriertem Harnstoff, der ausgeschieden wird. Die fraktionelle Harnstoff Ausscheidung wird analog zur FeNa berechnet:

$(\text{Harnstoff im Urin} \times \text{Kreatinin im Serum}) \times 100$

$\text{Harnstoff im Serum} \times \text{Kreatinin im Urin}$

Eine fraktionelle Harnstoff Ausscheidung > 35% spricht für intrarenales Nierenversagen; ein Wert < 35% - für prärenales Nierenversagen. Allerdings liegen die Sensitivität mit 63% und die Spezifität von 54% niedrig ⁽²⁵⁾.

4. Das Urinsediment wird traditionell für die Differenzierung zwischen prärenalem und intrarenalem Nierenversagen benutzt. Parazella et al ⁽²⁶⁾ schlugen ein Scoring-System vor, das die Präsenz von Zylindern im Urinsediment berücksichtigte. Dieses System hatte nach ihren Angaben eine hohe prognostische Aussagekraft (Sensitivität 73%, Spezifität 75%) in Bezug auf die Diagnose akuter Tubulusnekrosen (die häufigste Form des akuten intrarenalen Nierenversagens). Andere Autoren stellten allerdings fest, dass ein intrarenales Nierenversagen häufig mit einem normalen Urinsediment einhergehen kann ⁽²⁷⁾, und gelegentlich auch bei Patienten ohne Nierenversagen ein pathologisches Urinsediment gesehen werden kann ⁽²⁸⁾.

5. Das Verhältnis zwischen Harnstoff und Kreatinin im Serum (die Harnstoff/Kreatinin-Ratio) ist bei intrarenalem Nierenversagen durch akute Tubulus-Nekrose mit 10-15/1 (jeweils mg/dL) deutlich niedriger als beim prärenalen Nierenversagen (Verhältnis über 20/1) (Miller et al 1978 ⁽²¹⁾). Der dysproportionale Anstieg von Harnstoff im Vergleich zum Kreatinin bei prärenalen Nierenversagen wurde in einer Studie mit Intensivpatienten ⁽²⁹⁾ multifaktoriell erklärt: prärenales Nierenversagen tritt bei älteren und schwerer erkrankten Patienten mit Hyperkatabolismus auf.

In einigen Situationen ⁽³⁰⁾ bei z. B. gastrointestinalen Blutungen, Zellzerfall oder unter Therapie mit Kortikosteroiden wird Harnstoff vermehrt produziert, so dass die Ratio falsch hoch ist. Die Harnstoff/ Kreatinin- Ratio steigt auch bei Verlust der Muskelmasse

sowie bei chronisch kranken und älteren Patienten durch die verminderte Kreatinin-Produktion. In einer Studie mit 87 Patienten (Espinel et al, 1980 ⁽²²⁾) konnte mittels Harnstoff/Kreatinin- Ratio die richtige Diagnose (prärenales vs renales Nierenversagen) bei 65 Patienten gestellt werden.

Ein neues Review zu diesen Methoden kommt zum Schluss, dass sie zur Differenzierung des akuten Nierenversagens nicht ausreichend zuverlässig seien ⁽³¹⁾.

1.5 Prognose bei akutem Nierenversagen

Bagshaw et al ⁽³²⁾ 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). In der Praxis lässt sich die prognostische Aussagekraft der RIFLE-Klassifikation nicht immer nutzen: es wird für RIFLE-Einstufung ein Ausgangs-Kreatinin-Wert benötigt. Dieser Wert ist häufig, z.B. bei Hospitalisierung in der Rettungsstelle nicht bekannt. Außerdem ist die Messung der Urinausscheidung zeitaufwändig und häufig nicht durchführbar.

Patienten mit intrarenalem Nierenversagen haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit prärenalem oder postrenalem Nierenversagen. So hatten in der Madrid-Studie Patienten mit intrarenalem Nierenversagen eine Mortalität von 60%, Patienten mit prärenalen Nierenversagen 35%, Patienten mit postrenalem Nierenversagen 27% ⁽¹⁹⁾. Allerdings wird die Diagnose eines intrarenalen Nierenversagens wie oben dargestellt oft erst retrospektiv möglich.

Es wäre also wünschenswert, einen direkten Marker für Schwere und Art einer Nierenschädigung zu haben, um frühzeitig zu einer korrekten Diagnose und Prognose zu kommen.

1.6. Biomarker des akuten Nierenversagens

Parameter, die direkt mit Ausmaß und Art der Nierenschädigung korrelieren, könnten die Diagnose eines Nierenversagens beschleunigen und zwischen intrarenalen und

prärenalen Ursachen unterscheiden. Verschiedene Substanzen werden als potentielle Biomarker für akutes Nierenversagen untersucht.

Ein geeigneter Biomarker für das akute Nierenversagen soll nicht invasiv und schnell aus einer Blut- oder Urinprobe bestimmbar sein. Außerdem muss ein Biomarker folgende Kriterien erfüllen (³³):

1. Der Biomarker soll aus dem geschädigten Gewebe stammen. Nicht geschädigte Areale sollen keine Biomarker-Expression zeigen.
2. Die Konzentrationen des Biomarkers im Urin und Blut sollen mit der Expression des Biomarkers im geschädigten Gewebe ansteigen.
3. Schädigung und Biomarker-Anstieg sollen zeitlich möglichst eng gekoppelt sein.
4. Die Biomarker-Expression im geschädigten Organ und sein Spiegel im Blut und Urin sollen abfallen, sobald die Niere sich erholt.

1.7. Neutrophilen Gelatinase – assoziiertes Lipokalin (NGAL)

NGAL ist ein Protein aus der Lipokalin-Superfamilie. Lipokaline stellen eine große Protein-Gruppe dar, die unterschiedliche Funktionen hat, darunter den Transport verschiedener Substanzen, z.B. Retinol, und die enzymatische Synthese von Prostaglandinen. Außerdem spielen Lipokaline eine Rolle bei Immunreaktionen (³⁴).

NGAL wird bei verschiedenen Störungen in Neutrophilen, Hepatozyten und renalen Tubuluszellen produziert (³⁵). Es wirkt bakteriostatisch, indem es Bakterien Siderophoren entzieht (eisenbindende Moleküle) (³⁶). Außerdem spielt NGAL eine Rolle bei Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen, darunter auch Nierenepithelzellen.

Es gibt mehrere NGAL- Formen (³⁷): die monomere NGAL-Form (23-26 kDa), die homodimere Form (45 kDa) und die heterodimere Form (125 kDa). NGAL-Monomere (23-26 kDa) werden vorwiegend in tubulären Epithelzellen als Antwort auf akute Nierenschädigung produziert. In Gegensatz dazu wird die homodimere Form vorwiegend von neutrophilen Granulozyten produziert; sie wurde u.a. im Urin von Patienten mit Harnwegsinfekt nachgewiesen (^{38, 39}). In einigen Situationen bilden monomeres und homodimeres NGAL durch Disulfidbrücken Komplexe mit Gelatinase und existieren dann als heterodimere Form. Die Funktion dieser Form ist ungeklärt.

1.8. NGAL in Tiermodellen

Es gibt umfangreiche tierexperimentelle Daten, die NGAL im Urin als Bio-Marker einer Nierenschädigung, also eines intrinsisch renalen Nierenversagens, identifizierten: Das NGAL-Gen wird bei akuter Nierenschädigung in Maus-Modellen in der Niere stark herauf reguliert (⁴⁰). NGAL wird bei der Maus bei akuter ischämischer Nierenschädigung durch Unterbinden der A renalis in tubulären Epithelzellen der Nephrone vermehrt produziert (^{9, 41, 42, 43, 44}). Mishra et al 2004 (⁴⁴) zeigten, dass NGAL-mRNA in tubulären Zellen bei ischämischer und toxischer Schädigung vermehrt exprimiert ist. Gleichzeitig findet sich mittels Western Blot NGAL-Protein im Nierengewebe. Drei Stunden nach Ischämie wurde NGAL im Urin nachgewiesen. Die NGAL-Konzentration im Urin korrelierte mit Dosis und Dauer der Ischämie. Auch in Nierenzellkulturen wurde NGAL-mRNA eine Stunde nach in vitro Ischämie (durch ATP-Depletion) gefunden.

Die NGAL-Spiegel steigen in der ischämisch geschädigten Niere auf das 1000-fache an (Schmidt-Ott KM et al, 2006 (⁴²)). Das führt zu einer raschen Erhöhung der NGAL-Spiegel im Blut und Urin. NGAL wird im distalen Nephron als Antwort auf eine akute Nierenschädigung produziert. Auch im proximalen Nephron findet sich häufig auch eine erhöhte NGAL-Konzentration, die aber wahrscheinlich aus dem systemisch zirkulierenden NGAL-Pool stammt (z.B. aus Leukozyten).

Auch bei toxischer Nierenschädigung z. B. durch Cisplatin konnten erhöhte NGAL-Spiegel in Plasma und Urin in Tiermodellen nachgewiesen werden (Mishra J et al, 2003 (⁴¹) und 2004 (⁴⁴)).

In den dargestellten tierexperimentellen Studien wurde NGAL im Blut, im Urin sowie nach der Sektion in der Niere untersucht. Eine in vivo-Untersuchung fand nicht statt, so dass letztendlich nicht belegt war, ob NGAL tatsächlich in der Niere produziert wird und dann im Urin und Blut erscheint.

Um dies zu klären, wurden transgene Mäuse mit einem Luciferase-Reporter Gen im NGAL-Locus hergestellt (Paragas N et al, 2011 (³³)). Beim Hochregulieren des NGAL-Gens kommt es nach Hinzugabe eines geeigneten Substrats dadurch zu einer Biolumineszenz, die der Expression von NGAL entspricht und sich in vivo prüfen lässt.

In dieser Studie wurde eine Nierenarterie für 15 bzw. 30 Minuten unterbunden. Die Biolumineszenz der betroffenen Niere stieg innerhalb von 3 bis 6 Stunden nach

Arterienunterbindung auf das 10-fache an. Die Spitzenaktivität wurde 12 Stunden nach Ischämie festgestellt (25-80-facher Anstieg). Die Aktivität war Dosis-abhängig: nach 15-minütiger Ischämie stieg die Aktivität 25-fach an, nach 30-minütiger Ischämie 70-fach. Eine relevante Serum-Kreatinin-Erhöhung wurde erst nach 12 Stunden festgestellt.

In einem weiteren Experiment zur Bestätigung der NGAL-Produktion in der Niere wurden Cross-Transplantationen zwischen NGAL knockout (NGAL^{-/-}) und Wildtypmäusen (NGAL^{+/+}) durchgeführt. Nach der Transplantation wurde die Nierenarterie für 10 Minuten unterbunden. Die NGAL-Expression stieg bei NGAL-positiven Nieren stark an (um mehr als das 180-fache), auch wenn sie in Mäuse transplantiert worden waren, die selbst kein NGAL herstellen können. Knockout Nieren zeigten hingegen keinen relevanten Anstieg der NGAL-Expression (maximal 6-fach), auch dann nicht wenn sie in Mäuse transplantiert waren, die das Gen trugen und deren Leukozyten NGAL produzieren können.

Mittels in situ-Hybridisierung ließ NGAL sich in folgenden Teilen des Nierenmarks nachweisen: im aufsteigenden (distalen) Teil der Henle'schen Schleife, in den Sammelrohren und in der Makula densa. In den proximalen Tubuli fand sich keine NGAL-Produktion.

1.9 NGAL in klinischen Studien

In mehreren kleineren prospektiven klinischen Studien bei Kindern mit Nierenversagen nach kardiochirurgischen Eingriffen (^{11, 45, 46}) stieg Kreatinin 1-3 Tage nach der Operation an; NGAL im Blut und Urin bereits 2-6 Stunden postoperativ. Die Spezifität von NGAL im Urin zur Diagnose des akuten Nierenversagens betrug bei einem Cut-Off von 100 ng/mL 90%, die Sensitivität 82% (⁴⁵). 2 Stunden nach der Operation betrug die AUC-ROC für NGAL im Blut und Urin über 0.9 (⁴⁶). Die NGAL-Spiegel korrelierten mit dem Schweregrad des Nierenversagens, Dialyse-Notwendigkeit und Mortalität.

In ähnlichen Studien mit Erwachsenen (^{47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60}) wurde NGAL sowohl im Plasma als auch im Urin 1-3 Stunden nach der Herzoperation gefunden. In der Untersuchung von Wagener et al 2006 (⁴⁸) stieg uNGAL bei akutem Nierenversagen innerhalb von 3 Stunden an, während die Kreatinin- Erhöhung erst nach 24-48 Stunden folgte.

Allerdings variierte die AUC-ROC zwischen den verschiedenen Studien und betrug 0.61 bis 0.96 (^{48, 52, 53, 54, 55}). Das war von mehreren Faktoren abhängig: Alter, Nebenerkrankungen, vorbestehende chronische Niereninsuffizienz, längere Operationszeit bei schwerwiegenderen Befunden (⁴⁹). Die diagnostische Sicherheit von NGAL variierte abhängig von der vorbestehenden Nierenfunktion, sie war am Besten bei normaler renaler Funktion präoperativ (⁵⁰).

Da NGAL auch in neutrophilen Leukozyten produziert wird, ist es denkbar, dass es sich bei Harnwegsinfekt auch ohne Nierenschädigung im Urin findet. In einer Studie (³⁹) wurde uNGAL als Marker für Harnwegsinfekte bei Kindern getestet. NGAL-Werte über 20 ng/mL sprachen mit einer Spezifität von 76% und einer Sensitivität von 97% für einen Harnwegsinfekt (AUC-ROC 0.98). NGAL im Urin wurde mittels kommerzieller ELISA (CircuLex; Tera-Sawaoka, Japan) gemessen. Eine Kontrolle der Ergebnisse durch Immunoblot wurde nicht durchgeführt. Hohe NGAL-Werte im Urin bei Patienten mit Harnwegsinfekten ohne Nierenversagen können durch miterfasste heterodimere NGAL-Formen aus neutrophilen Leukozyten erklärt werden. Diese Studie wirft die Frage auf, ob NGAL-Bestimmung im Urin zur Diagnose eines Nierenversagens geeignet ist, wenn ein Harnwegsinfekt oder eine Sepsis besteht.

In Studien mit heterogenen Populationen konnte nachgewiesen werden, dass mittels NGAL eine frühe Diagnose von Nierenversagen (bis zu 48 Stunden vor dem Kreatinin-Anstieg) möglich ist. NGAL-Spiegel im Urin über 298 ng/mL sagte bei hospitalisierten Patienten mit Nierenversagen dauerhaftes Nierenversagen mit einer AUC-ROC von 0.88 vorher (⁵⁷). Bei kritisch Kranken konnte mittels NGAL im Urin ein Nierenversagen innerhalb von 24h nach Nierenschädigung mit AUC-ROC von 0.70 feststellen (⁵⁸). Die AUC-ROC von Plasma NGAL zur Diagnose eines akuten Nierenversagens betrug 0.78 (⁵⁹).

In einer monozentrischen Studie an 635 Rettungsstellen-Patienten unterschieden NGAL-Werte im Urin zwischen akutem prärenalem, intrinsisch renalem Nierenversagen, chronischer Niereninsuffizienz und normaler Nierenfunktion. Eine einzelne NGAL-Messung im Urin bei Hospitalisierung konnte akutes Nierenversagen mit einer AUC-ROC von 0.95 sichern (⁴⁷). NGAL hatte auch prognostischen Wert: bei Abnahme zu Dialyse-Beginn bei Patienten mit schwerem akutem Nierenversagen sagte Serum-NGAL die Mortalität mit einer AUC-ROC von 0.74 vorher (⁵¹).

2. Zielstellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der diagnostischen Wertigkeit von NGAL im Urin bei akutem Nierenversagen:

1. Es soll geklärt werden, ob ein kommerzieller Test (Architect platform, Abbott), der alle NGAL-Formen erfasst, der Western Blot-Bestimmung (differenziert zwischen den monomeren und anderen Formen) in der Diagnose des akuten Nierenversagens gleichwertig ist, oder ob der kommerzielle Test aufgrund unspezifischer NGAL-Erhöhungen (z.B. bei Harnwegsinfekt) weniger zuverlässig ist.
2. Es soll die Zuverlässigkeit von NGAL-Bestimmung im Urin zur Differentialdiagnose (intrinsisch renal vs. prärenal) und Prognoseabschätzung bei etabliertem Nierenversagen geprüft werden. Dazu wird eine monozentrische prospektiven Studie bei hospitalisierten Patienten durchgeführt

3. Methoden und Material

3.1. Material

3.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Gefrierschrank -65–85°C UF ultra low temperature F8011-1	Napco, Winchester, USA
Kühlschrank Kombination 4°C und -20°C	Liebherr, D
Mikroskop Olympus MO21	Olympus Optical GmbH, Hamburg, D
Roto-Shaker	Fisher Health Care, USA
Spannungsgerät: Electrophoresis Power Supply, Modell 3000xi	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge thermo scientific megafuge 1.0 Heraeus	Thermo Fisher scientific, USA

Tabelle 1: Verwendete Geräte

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Streifenfest für Urin Simens multistix 10 visual	Siemens AG, D
Safe-Lock Eppendorf Tubes, 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Pipettenspitzen blau 1,0ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Tris-HCL Polyakrylamid-Gel	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Handschuhe SafeSkin Satin Plus®	Kimberley Clark, Roswell, USA
Filter Papier – 35cm x 45cm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Whatman Paper Size 30cm x 3M	GE Healthcare
Audiographiefilm Kodak Biomax Light Film 13x18 cm	Kodak, Rochester, USA

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Medien, Reagenzien, Antikörper

Produkt	Hersteller
Methanol	Fisher Healthcare, USA
Glycine	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mäuse anti-humane NGAL-Antikörper	Antibody Shop, BioPorto Diagnostics, Gentofte, Denmark
Rekombinantes NGAL	R&D Systems
Western Blotting Detection Reagent	Amersham ECL GE Healthcare
ECL Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked whole antibody GE	Healthcare UK limited
Tris	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Tween 20	BioRad, Hercules, CA,, USA

Tabelle 3: Verwendete Medien, Reagenzien, Antikörper

3.1.4. Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
TBS-T	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 1% Milchpulver
Nicht-reduzierender Probenpuffer:	500 mM Tris-HCl (pH 6,8); 221mM Glycerol; 0,03mM Bromphenol blau; 0,6mM SDS
Lauf-Puffer	100 mL nicht reduzierender Probenpuffer aufgefüllt mit 900 mL diszilliertes Wasser
Blot-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 493 mM Methanol

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

3.2 Methoden

3.2.1 Zuverlässigkeit eines kommerziellen Messverfahrens für NGAL (Architect platform, Abbott) in der Diagnostik des akuten Nierenversagens im Vergleich zur Messung von monomeren NGAL mittels Westernblot

3.2.2 Klinische Studie: Untersuchung der Test-Charakteristika von Urin-NGAL bei Patienten mit etabliertem akutem Nierenversagen zur Differenzialdiagnose von intrinsisch renalen vs. prärenalen Ursachen und zur Prognoseabschätzung

3.2.1. Zuverlässigkeit eines kommerziellen Messverfahrens

Um ein kommerzielles Messverfahren für NGAL (*Architect platform, Abbott*) mit Western Blot Bestimmungsmethoden zu vergleichen wurden Urinproben von 1635 erwachsenen Patienten untersucht, die über die Rettungsstellen dreier tertiärer Krankenhäuser (Allen Hospital of New York-Presbyterian Hospital, Staten Island University Hospital und Helios Klinikum Berlin-Buch) stationär aufgenommen wurden (Nickolas et al. 2012 (⁶¹)). Dialysepatienten und Patienten mit Krankenhausaufenthalt unter 24 Stunden wurden ausgeschlossen. Der Urin wurde beim Einschluss abgenommen, bei 12000 U/m 10 Minuten zentrifugiert, abpipetiert und innerhalb von sechs Stunden auf -80°C gekühlt.

Alle Urin-Proben wurden sowohl mittels der kommerziellen Messmethode für NGAL als auch mittels eines spezifischen Immunoblots (Westernblots) für monomeres NGAL

untersucht. Die Isoform-Selektivität der kommerziellen Methode ist nicht charakterisiert und könnte zusätzlich zum monomeren NGAL auch NGAL-Multimere umfassen.

Die Daten wurde im Rahmen der oben erwähnten multizentrischen Studie ⁽⁶¹⁾ zur Zuverlässigkeit der Bestimmung von NGAL und vier anderen potentiellen Biomarkern des akuten Nierenversagens im Urin in der frühen Diagnose, Differentialdiagnose und Prognose von akutem Nierenversagen in der Rettungsstelle erhoben.

ARCHITECT®-Plattform

uNGAL wurde mittels eines kommerziell verfügbaren Verfahrens bestimmt (ARCHITECT®, Abbott Laboratories) ⁽⁶²⁾. Es handelt sich um einen Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) zur quantitativen Bestimmung des neutrophilen Gelatinase-assoziierten Lipocalins (NGAL) im Urin. Der CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay) ist ein Immunoassay mit zwei Antikörpern. Der erste Antikörper bindet an alle NGAL Formen. Er ist mit paramagnetischen Partikeln verbunden. Der zweite Antikörper ist mit Akridinium verbunden. Der Urin wird zusammen mit den paramagnetischen Mikropartikeln 18 Minuten inkubiert. Die Mikropartikel werden gewaschen, so dass vom Urin nur noch daran gebundenes NGAL verbleibt. Dann werden Akridinium markierte Antikörper für vier Minuten dazu gegeben. Nach dem zweiten Waschen wird Akridinium mit Peroxid und Base zum Leuchten gebracht (Chemilumineszenz). Die Helligkeit des Signals wird an einer bekannten Konzentration von rekombinantem NGAL geeicht. Die maximal messbare NGAL-Konzentration beträgt 1500 ng/mL. Proben mit größerer Konzentration werden zunächst verdünnt und dann die NGAL-Bestimmung durchgeführt.

WESTERN BLOT

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern ⁽⁶³⁾. Hierbei wird ein Proteingemisch elektrophoretisch durch Acrylamidgel gezogen und aufgetrennt. Anschließend wird es durch erneute Elektrophorese an gleicher Position auf eine darauf gelegte Nitrocellulose-Membran übertragen (als „Sandwich“ „geblottet“). Dort wird das Zielprotein mit einem primären Antikörper gebunden. Es wird ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, der an den ersten

Antikörper bindet. Der zweite Antikörper bindet Meerrettichperoxidase, die ihrerseits mit einem „enhanced chemiluminiscent“ (ECL) Substrat reagiert und dabei Licht erzeugt. Die Nitrozellulose wird dazu auf einen Röntgenfilm gelegt, so dass Proteine, die Antikörper gebunden haben als Banden auf dem Film sichtbar werden.

Vorbereitung der Urinproben:

10 uL Urinproben wurden mit 5 uL Probenpuffer (Tabelle 4: Probenpuffer) aufgefüllt, eine Minute lang im Wasserbad gekocht und dann 20 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden gepufferte Urinproben auf 4-20% Tris-HCL Polyakrylamid-Gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) aufgetragen, pro Gel 6 Urinproben und 4 Standard-Proben (3.0; 1.3; 0.7 und 0.3 ng/uL) mit rekombinatem NGAL (R&D).

Elektrophorese:

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA für 40-60 Minuten durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde die Kammer mit Laufpuffer (Tabelle 4: Laufpuffer) gefüllt. Eine optische Kontrolle der Elektrophorese war über die Auftrennung des angefärbten Standards möglich

Vorbereitung der Sandwiches:

Die Nitrozellulose-Membran, ein Filterpapier und zwei Schwämme wurden im Blotpuffer (Tabelle 4: Blotpuffer) eingeweicht. Das Filterpapier wurde auf das Polyacrylamid-Gel gelegt, darauf die Nitrozellulose-Membran, darauf wieder Filterpapier. Von beiden Seiten kam ein Schwamm dazu.

Blot:

Die vorbereitete Sandwiches wurden in mit Blotpuffer (Tabelle 4: Blotpuffer) gefüllter Box auf Eis für 2,5 h unter einer Spannung von 250mV mit der Minus-Elektrode auf der Polyamylacrid-Gel-Seite ausgesetzt („geblottet“).

Anschließend wurde das Sandwich entnommen, und es wurden Schicht für Schicht alle Teile entfernt, bis nur noch die Nitrozellulosemembran übrig bleibt. Sie wurde dann für eine Stunde auf einem Roto-Shaker behandelt. Dazu wurden in etwa 20mL TBS-T (Tabelle 4: TBS-T) verwendet.

Primär- Antikörper:

Die Membran wurde nun mit einer verdünnten Antikörper-Lösung behandelt (Mäuse anti-humane NGAL-Antikörper 1:1000 (3 uL) Antibody Shop, BioPorto Diagnostics, Gentofte, Denmark). 3 mL von TBS-T (Tabelle 4: TBS-T) wurden hinzugefügt. Der Vorgang wurde bei 4° C über Nacht durchgeführt.

Sekundär-Antikörper:

Fünf Waschschrte in TBS-T (Tabelle 4: TBS-T) für 5-10 Minuten entfernten schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Eine zweite Lösung mit dem Sekundär-Antikörper (4 uL Antikörper (Anti-Maus IgG (Anti-human)) mit Verdünnung von 1:5000) wurde auf die Membran gegeben. Dazu wurden 20 mL TBS-T hinzugegeben. Die Membran wurde eine Stunde mit sekundären Antikörpern behandelt. Nach einer Stunde wurde die Membran erneut fünf Mal in TBS-T 5 bis 10 Minuten gewaschen.

Detektierung:

Zur Detektierung wurde ein Fluoreszenzverfahren verwendet. Dazu wurden 3 mL der beiden ECL-Reagenzien (Tabelle 3) im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Minute auf die Membran gebracht. Danach wurde die Membran in einer Folie eingeschweißt und auf den Röntgenfilm gelegt. Im Anschluss wurde der Röntgenfilm entwickelt und die Banden wurden sichtbar (Abbildung 2). Die einzelnen NGAL-Fraktionen (25 kDa Monomere und Multimere unterschiedlichen Molekulargewichts) erschienen aufgrund der elektrophoretischen Auftrennung an verschiedenen Stellen.

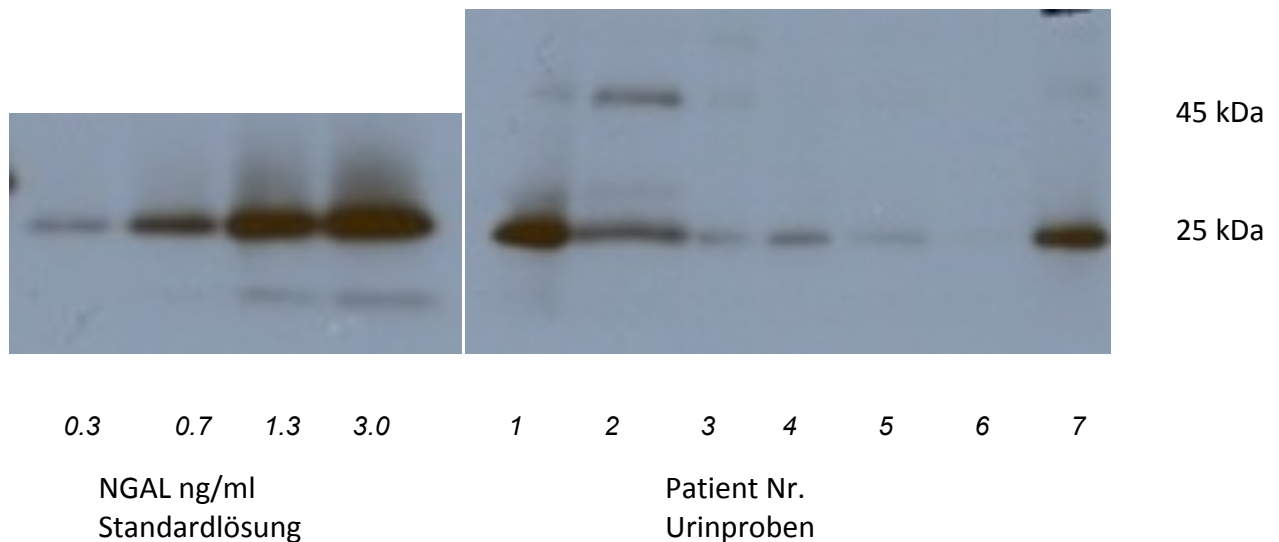


Abbildung 2: Western Blot zum Nachweis von monomerem uNGAL (25 kDa): links vier Standardlösungen mit aufsteigender NGAL-Konzentration; rechts: Urinproben von sieben Patienten. Die Patienten 3, 4, 5 haben sehr geringe Konzentration an NGAL-Monomeren (25 kDa) im Urin; Patient 6 hat gar kein monomeres (25 kDa) NGAL im Urin; Patient 2 hat eine mittlere NGAL-Konzentration und die Patienten 1 und 7 haben hohe NGAL-Konzentrationen. Die genaue Konzentration wurde densitometrisch bestimmt. Patient 2 hat zusätzlich eine Bande bei 45 kDa, entsprechend der homodimeren Form von NGAL (nicht renalen Ursprungs).

Die Konzentration der Proben wurde densitometrisch bestimmt. Die Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte (Farbmenge pro Flächeneinheit). Hierzu wird ein Messgerät zunächst auf dem Trägermedium an einer unbehandelten Stelle auf Null kalibriert. Dann strahlt man Licht einer genau definierten Wellenlänge auf die Farbschicht. Das Licht durchdringt diese Farbschicht und wird dabei gefiltert, wodurch bestimmte Wellenlängen wegfallen oder in ihrer Intensität reduziert werden. Das Restlicht tritt auf der Rückseite wieder aus. So kann die Lichtmenge und Lichtart im Messgerät photoelektrisch gemessen werden. Für die Konzentrationsmessung wurde „Image J – densitometry“ Software benutzt.

3.2.2 Klinische Studie

Es wurden 161 erwachsene Patienten des Helios-Klinikums Berlin-Buch eingeschlossen, die nach Krankenhausaufnahme ein akutes Nierenversagen nach RIFLE Kriterien entwickelt hatten (Kreatinin-Anstieg um mindestens 50% oder 25%

Abfall der glomerulären Filtrationsrate im Vergleich zu den Ausgangswerten). Die Patienten wurden über die Studie informiert und um ihr schriftliches Einverständnis gebeten. Ausgangswerte für Kreatinin und glomeruläre Filtrationsrate wurde aus den letzten 12 Monaten vor der Entwicklung des akuten Nierenversagens ermittelt. Diese Werte wurden entweder aus der elektronischen Datenbank der Klinik oder durch die Befragung des Hausarztes festgestellt.

Urinproben wurden beim Einschluss und 2 Tage später abgenommen. Sie wurden bei 3000 U/m 10 Minuten zentrifugiert, abpipetiert und innerhalb von sechs Stunden auf -80°C gekühlt. uNGAL wurde in diesen Proben mittels der kommerziellen Sandwich-Plattform bestimmt (ARCHITECT®, Abbott Laboratories) (⁶²).

Kreatinin wurde nach der Jaffe-Methode gemessen, Natrium mittels ionenselektiver Elektrode und Harnstoff nach der Harnstoff/Glutamat basierten Kinetik-Methode. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde nach der Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)-Formel (⁶⁴) berechnet.

Die Differenzierung zwischen intrinsisch renalen und prärenalen Ursachen wurde anhand aller am Ende der Behandlung vorliegenden Unterlagen und elektronischen Daten vorgenommen. Patienten mit postrenalem Nierenversagen wurden ausgeschlossen. Die Diagnose wurde von zwei Nephrologen unabhängig voneinander gestellt, die bezüglich der NGAL-Werte verblindet waren. Bei abweichenden Meinungen besprachen sich die beiden Nephrologen; falls keine Übereinstimmung erzielt werden konnte, galt die Ursache des Nierenversagens als unklassifizierbar.

3.2.3 Statistik

A: Vergleichsmaße zwischen klinischer Plattform und Western-Blot-Analyse

1. Korrelation

Die beiden Messwert-Verteilungen (Abbott und Western Blot) wurden mittels Pearson'

Korrelations-Koeffizient miteinander verglichen: $\rho(X, Y) = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma(X)\sigma(Y)}$. Das ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei normal verteilten Merkmalen. Er kann die Werte zwischen +1 und -1 annehmen, wobei

bei -1 ein vollständig negativer linearer Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen besteht und bei + 1 ein vollständig positiver Zusammenhang. Die Signifikanz des Zusammenhangs wurde mittels einseitigem t-Test überprüft, Signifikanz wurde bei $p < 0.005$ angenommen.

2. Vergleichende ROC-Analyse

Als zweites Maß für die Konkordanz zwischen klinischem Assay und experimenteller Validierung mittels Western Blot wurden die diagnostischen Testcharakteristika beider Methoden verglichen. Die detaillierte diagnostische Einordnung der Patienten ist in Nickolas et al, 2012 ⁽⁶¹⁾ beschrieben und nicht Teil dieser Dissertation und wird daher hier nur kurz zusammengefasst:

Durch klinische Adjudikation wurden die in die Studie eingeschlossenen Patienten in solche mit intrinsischem renalem Nierenversagen (n=96) und solche mit anderen Diagnosen (prärenales Nierenversagen, stabile chronische Niereninsuffizienz, normale Nierenfunktion; n=1138) eingeteilt. Wir bestimmten für beide Nachweisverfahren (klinische Plattform oder Western Blot) die Fläche unter der Receiver Operating Characteristic (AUC-ROC) zur Unterscheidung zwischen intrinsische akutem Nierenversagen und anderen Diagnosen. Zum Vergleich wurden auch die AUC-ROCs anderer in der Studie bestimmter Biomarker hinzugezogen.

B. Statistik in der klinischen Studie:

Für die statistischen Analysen wurden PASW Statistics Version 18.0 und 19.0 (SPSS, Chicago, Illinois) verwendet. Kontinuierliche Variablen wurden mittels Student T-Test verglichen, kategoriale Variablen mittels χ^2 Quadrat Test. Wir verwarfen die Nullhypothese bei $p \leq 0.05$. Die Werte wurden als Mittelwert (\pm Standardabweichung) oder als Median (\pm Interquartilsabstand) dargestellt. Wir berechneten Sensitivität, Spezifität, Positiven Vorhersagewert, Negativen Vorhersagewert, Positive Likelihood Ratio und Negative Likelihood Ratio einschließlich der 95% Konfidenz Intervalle.

Wir bestimmten Receiver operating characteristics (ROC). Die ROC zeigen Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests an und messen seine Aussagekraft. Sie ermöglichen den Vergleich verschiedener klinischer Testverfahren, indem sie eine Maß dafür geben, wie gut jeder Test zwischen „gesund“ und „krank“ unterscheidet.

Verschiedene ‚cut-off‘ Werte, z. B. Konzentrationen von Biomarkern, Sensitivität und Spezifität werden gegeneinander aufgetragen. Die Fläche unter der Kurve kann dabei Werte zwischen 0.5 und 1.0 annehmen, wobei 0.5 keinen diagnostischen Gewinn bedeutet, 1.0 würde absolute Zuverlässigkeit anzeigen. Die Standardfehler der bestimmten Flächen wurden bei einem Konfidenzintervall von 95% miteinander verglichen. Weil die Daten für alle konventionellen Parameter des akuten Nierenversagens und für die neuen Biomarker von den selben Patienten stammten, also miteinander korrelierten, musste zum Vergleich der Daten eine non-parametrische Schätzung nach dem Verfahren von deLong und Clarke-Pearson durchgeführt werden⁽⁶⁵⁾.

Es wurden uni- und multivariate logistische Regressionen durchgeführt, um Zusammenhänge fest zu stellen zwischen

1. Biomarkern (NGAL, fraktionelle Na-Exkretion, fraktionelle Harnstoff-Exkretion, Serum-Kreatinin, Harnstoff/Kreatinin-Ratio),
2. demographischen Variablen (Alter > 70 Jahre, Geschlecht, Rasse),
3. Nebenerkrankungen (Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankungen, chronische Niereninsuffizienz)
4. RIFLE-Stufe bei Einschluss

einerseits und

dem Verlauf gemessen am kombinierten Endpunkt aus Progression des Nierenversagens um mindestens eine RIFLE-Stufe, Dialyse und Tod andererseits.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich zwischen beiden Bestimmungsmethoden

uNGAL-Spiegel, die mittels Architect-Plattform bestimmt wurden, korrelierten eng mit Messungen der monomeren NGAL-Form mittels Immunoblot (Pearson correlation 0.93,

p<0.0001, Abbildung 3).

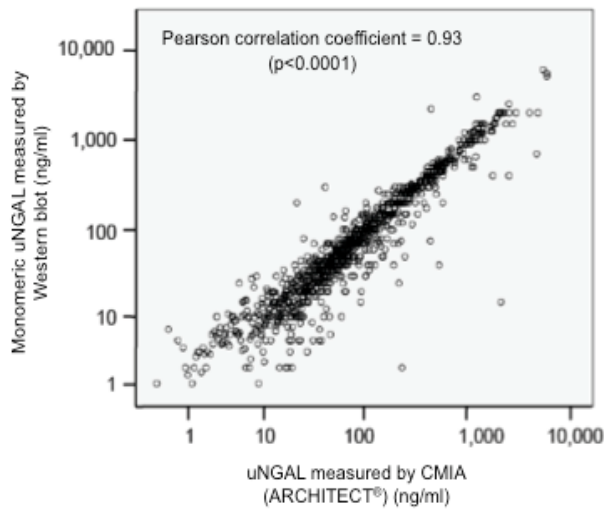


Abbildung 3: Korrelation zwischen NGAL- Spiegel gemessen mit chemilumineszenten Immunoassay (CMIA Abbott Architect-Plattform) und monomerem NGAL, gemessen mit Western Blot (beide Messungen im Urin).

Die AUC-ROC von NGAL im Urin für die Diagnostik von intrinsisch renalem Nierenversagen war bei beiden Methoden nahezu identisch. Sie betrug für die Architect-Plattform 0.81 (Konfidenz-Intervall, KI, 0.76-0.86), für den Western Blot ebenfalls 0.81 (KI 0.75-0.86) (Abbildung 4). Andere in der Studie bestimmte Biomarker (nicht Teil dieser Dissertation) sind zum Vergleich gezeigt.

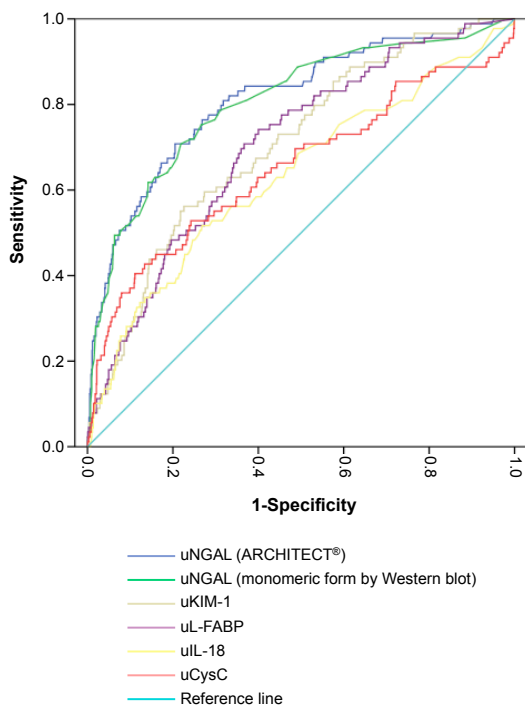


Abbildung 4: ROC-Kurven für 5 Urinbiomarker für die Detektion von akutem intrinsisch renalem Nierenversagen (vs. prärenales Nierenversagen, stabile chronische Niereninsuffizienz oder normale Nierenfunktion). Referenzlinie für den Vergleich zeigt AUC-ROC von 0.5. Blau zeigt uNGAL gemessen mittels Architect Plattform; grün-mittels Western Blot. Die Messungen der übrigen Biomarker waren nicht Teil dieser Arbeit.

Diese Ergebnisse zeigen, dass monomeres uNGAL die klinisch relevante molekulare Form beim akuten Nierenversagen darstellt. Diese Bestimmung kann gleichwertig sowohl mithilfe der experimentellen Methode (Monomer-spezifischer Western Blot), als auch mit der kommerziell vorhandenen Plattform von Abbott nachgewiesen werden.

4.2. Ergebnisse der klinischen Studie

Von zunächst 161 Patienten wurden 16 ausgeschlossen: 6 hatten ein postrenales Nierenversagen, bei 10 war die klinische Dokumentation unzureichend.

Von den verbleibenden 145 Patienten hatten 32 (22,1%) akutes Nierenversagen RIFLE-R, 65 Patienten (44,8%) akutes Nierenversagen RIFLE-I und 48 (33,1%) hatten akutes Nierenversagen RIFLE-F.

Patienten mit prärenalem Nierenversagen waren signifikant älter als Patienten mit intrarenalem Nierenversagen (71 vs. 64 Jahre), sie waren häufiger herzinsuffizient

(81% vs. 56%) und hatten in einem höheren Prozentsatz eine fortgeschrittene chronische Niereninsuffizienz (44% vs. 25%). Die übrigen demographischen Daten und Komorbiditäten unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 5).

Charakteristika	Alle Patienten	Nierenversagen beim Einschluss		
		Intrinsisch(n=75)	Prärenal(n=32)	Unklassifiziert (n=38)
Demographische Daten				
Alter, Mittelwert, Jahre, (SD)	67.7 (14.4)	64.3 (15.5)*	71.1 (14.2)	71.5 (10.7)
Frauen, n (%)	59 (40,7%)	27 (36%)	14 (43.8%)	18 (47.4%)
Afroamerikanisch, n (%)	1 (0.7%)	0 (0%)	1 (3.1%)	0 (0%)
Komorbiditäten				
Herzinsuffizienz, n (%)	101 (69.7%)	42 (56%)*	26 (81.3%)	33 (86.8%)
Diabetes mellitus, n (%)	42 (29%)	19 (25.3%)	11 (34.4%)	12 (31.6%)
Hypertonus, n (%)	118 (81.4%)	54 (72%)	28 (87.5%)	36 (94.7%)
KHK, n (%)	44 (30.3%)	18 (24%)	11 (34.4%)	15 (39.5%)
PAVK, n (%)	21 (14.5%)	10 (13.3%)	6 (18.8%)	5 (13.2%)
ZVE, n (%)	13 (9%)	7 (9.3%)	2 (6.3%)	4 (10.5%)
CNI \geq KDOQI Stadium III bei Einschluss, n (%)	38 (26.2%)	19 (25.3%)	14 (43.8%)	5 (13.2%)

*Tabelle 5: Demographische Daten und Komorbiditäten. CNI-chronische Niereninsuffizienz. Glomeruläre Filtrationsrate für CNI Stadium wurde nach der Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)-Formel berechnet. KHK-koronare Herzerkrankung, PAVK-periphere arterielle Verschlusskrankheit. ZVE-zerebrovaskuläre Erkrankungen. * = $p < 0.05$ zwischen Patientengruppen mit intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen, berechnet mit Student-t-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.*

4.2.1 Differenzialdiagnose zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen

32 Patienten hatten anhand der klinischen und laborchemischen Informationen eindeutig ein prärenales Nierenversagen und 75 Patienten ein intrinsisch renales Nierenversagen (davon 46 Patienten die klinische Diagnose einer akuten Tubulusnekrose; 9 Patienten nephrotoxisch bedingt; 7 Patienten akute Glomerulonephritis; 13 Patienten andere Ursachen).

38 Patienten konnten nicht klassifiziert werden: in 24 Fällen konnte anhand der Informationen nicht sicher zwischen einem prärenalen und einem intrarenalen Nierenversagen differenziert werden. 14 Patienten mit einem prärenalen Nierenversagen hatten im weiteren stationären Aufenthalt zusätzlich ein nierenschädigendes Ereignis, welches die Kreatinin-Dynamik veränderte und somit uninterpretierbar machte (Abbildung 5).

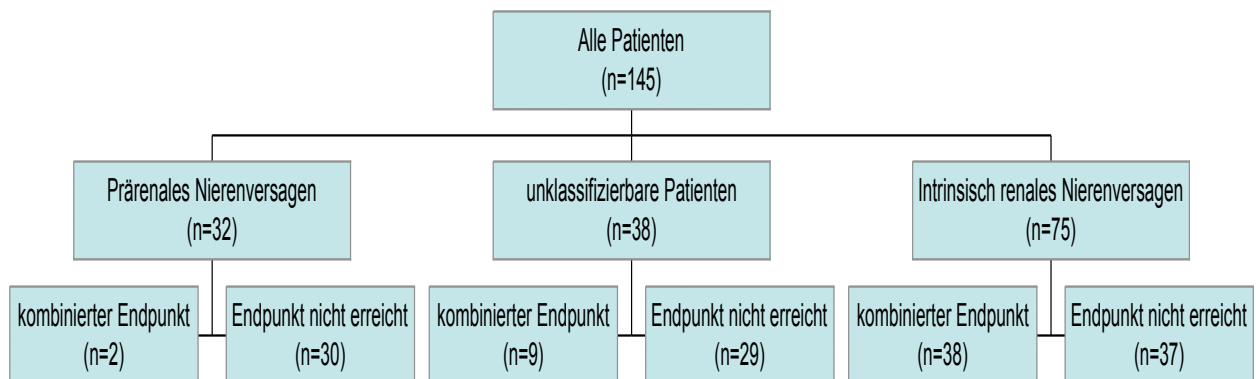


Abbildung 5: Patientenklassifizierung. Kombiniertes Endpunkt bestehend aus Progression des Nierenversagens (RIFLE-R zu RIFLE-I oder RIFLE-I zu RIFLE-F) innerhalb von 7 Tagen nach Einschluss, Notwendigkeit der Nierenersatztherapie oder Mortalität.

Patienten mit intrinsischem Nierenversagen hatten höhere Kreatinin-Werte bei Einschluss (233 vs. 175 $\mu\text{mol/L}$) und eine niedrigere Serum Harnstoff/Serum Kreatinin Ratio (70 vs. 96). Die NGAL-Werte waren bei Patienten mit intrinsisch renalem Nierenversagen erheblich höher als bei Patienten mit prärenalem Nierenversagen (256 vs 31 $\mu\text{g/L}$). Im Verlauf blieben uNGAL-Werte bei Patienten mit akutem intrinsischem Nierenversagen höher als bei Patienten mit prärenalem Nierenversagen. (Tabelle 6, Abbildung 6).

Charakteristika	Alle Patienten	Nierenversagen bei Einschluss		
		Intrinsisch n=75	Prärenal n=32	Unklassifiziert n=38
Nierenparameter bei Einschluss				
Ausgangs-Serum-Kreatinin (Median in umol/L (IQR))	87 (69-106)	83 (69-108)	96 (77-116)	79 (67-95)
Serum Kreatinin bei Einschluss (Median in umol/L (IQR))	202 (158-264)	233 (190-357)*	176 (141-223)	168 (152-220)
Serum Harnstoff/Serum Kreatinin Ratio (Median (IQR))	82 (57-100)	70 (48-91)	96 (69-123)	90 (76-175)
FeNa (Median in % (IQR))	0.9 (0.3-2.2)	1 (0.4-2.7)	1 (0.3-2.1)	0.6 (0.2-2.2)
FeBUN% (Median in % (IQR))	25 (16-43)	34 (15-50)	24 (16-32)	20 (14-31)
NGAL bei Einschluss (Median in ug/L (IQR))	95.4 (37.6-362.2)	256 (99-873)	31 (16-76)	49.3 (29.8-112.1)
NGAL/Kreatinin Ratio bei Einschluss, (Median in ug/g (IQR))	116 (36-371)	274 (113-891)**	37 (19-76)	52 (27-166)

Tabelle 6: Nierenparameter bei Einschluss. IQR-Interquartilabstand, FeNa-fraktionelle Natrium Exkretion, FeBUN-fraktionelle Harnstoff Exkretion. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ zwischen Patientengruppen mit intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen, berechnet mit Student-t-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.

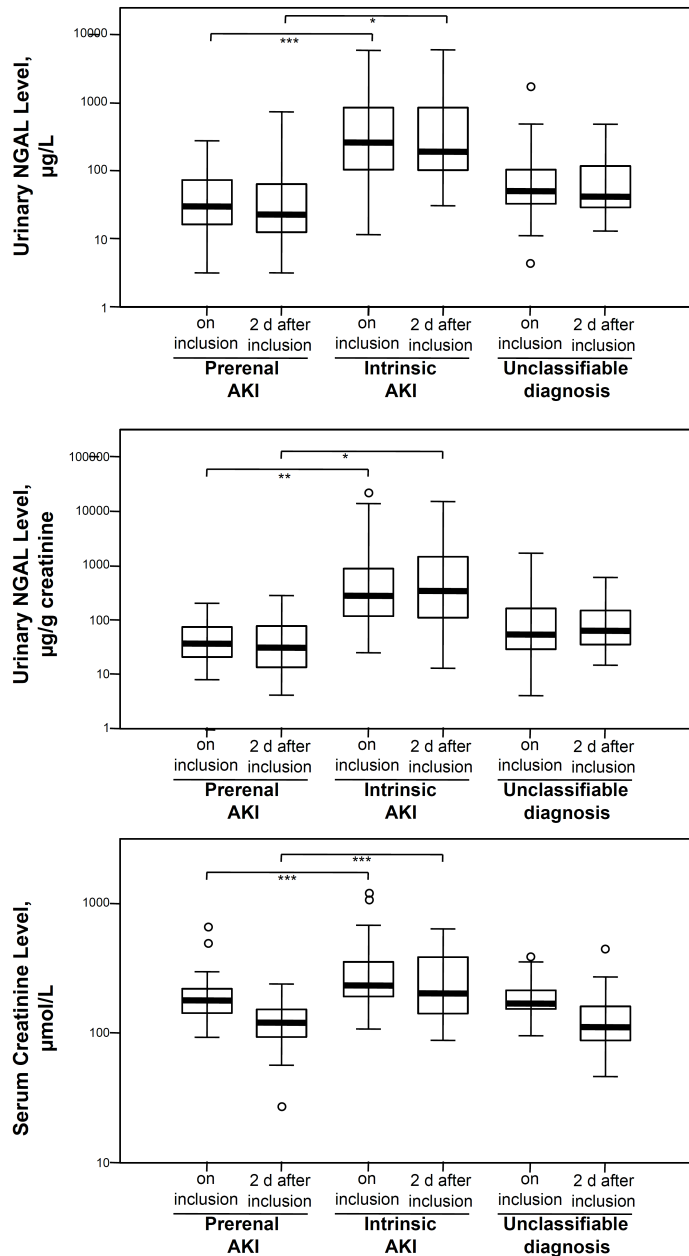


Abbildung 6. NGAL im Urin, Serum Kreatinin und NGAL/Kreatinin Ratio (beide im Urin) zur Differenzialdiagnose zwischen prärenalem und intrinsisch renalem Nierenversagen. Biomarker sind auf einer log₁₀ Skala aufgetragen. Die Boxen zeigen den Median sowie die untere und obere Quartile. Die Begrenzung oberhalb und unterhalb der Boxen kennzeichnet Daten innerhalb des 1.5 Interquartil-Abstandes der log₁₀ transformierten Biomarker-Spiegel von der oberen bzw. unteren Quartile. Kreise zeigen Ausreißer. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

4.2.2 Differenzialdiagnose mittels herkömmlicher Parameter am ersten Tag

Für die Differenzialdiagnose zwischen renalem und prärenalem Nierenversagen wurden AUC-ROC berechnet. Die Treffsicherheit gemessen an der AUC-ROC betrug (Tabelle 7):

Test	Nierenversagen renal (vs. prärenal)
Serum Kreatinin	0.74 (0.63-0.84); p<0.001
RIFLE -Stufe	0.72 (0.62–0.82); p<0.001
Fraktionelle Harnstoffexkretion	0.59 (0.48–0.71); n.s.
Fraktionelle Natriumexkretion	0.54 (0.42–0.65); n.s.
Serum Harnstoff / Kreatinin-Ratio	0.71 (0.59–0.82); p<0.01

Tabelle 7: Treffsicherheit von herkömmlichen Parametern gemessen an der AUC-ROC (95% Konfidenz-Intervalle).

4.2.3 Differenzialdiagnose zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen mittels uNGAL am ersten Tag

Die Treffsicherheit gemessen an der AUC-ROC (95% Konfidenz-Intervalle) betrug für NGAL im Urin: 0.87, (KI= 0.81–0.94), p<0.001 und für uNGAL/uKreatinin (beide Werte bestimmt im Urin): 0.89 (0.82–0.95), p<0.001. Beide AUC-ROC waren signifikant besser als die herkömmlichen Parameter (p jeweils <0.05).

Für NGAL und konventionelle diagnostische Parameter wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert und positive und negative Likelihood Ratio berechnet (Tabelle 8). Die Cutoff-Werte für NGAL wurden der oben erwähnten Multizenterstudie zur Diagnose von Nierenversagen in der Rettungsstelle (Nickolas TL, et al, 2012 ⁽⁶¹⁾) entnommen. NGAL-Werte im Urin über 104 ug/L hatten eine hohe Spezifität (0.88) und hohe positive Likelihood-Ratio (5.97) für die Diagnose von intrinsisch renalem Nierenversagen. Dagegen gewährleistete ein NGAL-Cutoff von 47 ug/L eine hohe Sensitivität (0.89) und eine niedrige negative Likelihood-Ratio (0.2), NGAL-Werte unter 47 µg/L sprachen also klar gegen ein intrinsisch renales Nierenversagen. Die Berechnung der NGAL-Werte auf Kreatinin im Urin (Urin-

NGAL/Urin-Kreatinin) änderte die Aussagekraft nicht substantiell.

Biomarker	Cut Off	Sensitivität	Spezifität	Positiver prädiktiver Wert	Negativer prädiktiver Wert	Positive likelihood ratio	Negative likelihood ratio
uNGAL absoluter Wert (ug/L)	>47	0.89 (0.8-0.95)	0.53 (0.35-0.7)	0.82 (0.71-0.89)	0.68 (0.46-0.84)	1.91 (1.31-2.78)	0.2 (0.1-0.41)
	>104	0.75 (0.63-0.84)	0.88 (0.7-0.96)	0.93 (0.83-0.98)	0.6 (0.44-0.73)	5.97 (2.37-15.08)	0.29 (0.19-0.43)
uNGAL pro u Kreatinin ug/g	>45	0.88 (0.78-0.94)	0.55 (0.36-0.72)	0.82 (0.72-0.9)	0.65 (0.44-0.82)	1.94 (1.31-2.89)	0.22 (0.11-0.43)
	>128	0.72 (0.6-0.81)	0.87 (0.69-0.96)	0.93 (0.82-0.98)	0.56 (0.41-0.7)	5.55 (2.2-14.01)	0.33 (0.22-0.47)
sKreatinin (umol/L)	>167	0.85 (0.75-0.92)	0.44 (0.27-0.62)	0.78 (0.67-0.86)	0.56 (0.35-0.75)	1.52 (1.1-2.09)	0.34 (0.18-0.63)
	>205	0.63 (0.51-0.73)	0.66 (0.47-0.81)	0.81 (0.68-0.9)	0.43 (0.29-0.58)	1.82 (1.1-3.03)	0.57 (0.41-0.79)
RIFLE Stufe	I	0.88 (0.78-0.94)	0.34 (0.19-0.53)	0.76 (0.65-0.84)	0.55 (0.32-0.76)	1.34 (1.03-1.75)	0.35 (0.17-0.72)
	F	0.49 (0.38-0.61)	0.88 (0.7-0.96)	0.9 (0.76-0.97)	0.42 (0.31-0.55)	3.95 (1.53-10.15)	0.58 (0.46-0.73)
sHarnstoff/s Kreatinin Ratio beide in mmol/L	<63	0.45 (0.34-0.57)	0.89 (0.7-0.97)	0.92 (0.76-0.98)	0.38 (0.26-0.51)	4.07 (1.36-12.18)	0.62 (0.5-0.77)
	<84	0.63 (0.51-0.74)	0.63 (0.42-0.8)	0.82 (0.69-0.91)	0.39 (0.25-0.54)	1.7 (1.01-2.87)	0.59 (0.42-0.83)

Tabelle 8. Test Charakteristika von Biomarkern zur Differenzierung zwischen intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen bei unterschiedlichen Cut-Offs. uNGAL-NGAL im Urin. uKreatinin-Kreatinin im Urin. sKreatinin-Kreatinin im Serum. sHarnstoff-Harnstoff im Serum.

4.2.4 Prognose

Als kombinierter Endpunkt einer schlechten Prognose wurde festgelegt: Erhöhung der RIFLE-Stufe; Dialyse; Tod.

49 Patienten (33,8%) erreichten diesen Endpunkt: 19 Patienten (13,1%) zeigten eine weitere Nierenfunktionsverschlechterung mit Erhöhung der RIFLE-Stufe, 18 Patienten (12,4%) mussten dialysiert werden, 28 Patienten (19,3%) verstarben.

Von den 49 Patienten, die den Endpunkt erreichten, hatten 38 (50,7%) renales Nierenversagen und 2 Patienten (6,3%) prärenales Nierenversagen ($p < 0.001$). Von diesen 2 Patienten musste ein Patient bei Diuretika-induziertem Nierenversagen einmalig dialysiert werden. Nach der Dialyse erholte sich die Nierenfunktion rasch. Der zweite Patient hatte Durchfall-induziertes Nierenversagen. Auch seine Nierenfunktion erholte sich rasch. Allerdings starben beide Patienten an anderen Komplikationen.

Demografische Daten, Nebenerkrankungen und Anteil an Patienten mit einer vorbestehenden chronischen Niereninsuffizienz unterschieden sich nicht zwischen Patienten mit und ohne kombinierten Endpunkt. Auch die Parameter RIFLE-Stufe, Harnstoff/Kreatinin Ratio, Fraktionelle Natrium- und Harnstoffexkretion zeigten keine relevanten Differenzen zwischen den Gruppen (Tabelle 9 und Abbildung 7).

Charakteristika	Alle Patienten	Klinischer Verlauf nach Einschluss	
		Kombinierter Endpunkt (n=49)	Endpunkt nicht erreicht (n=94)
Demographische Daten			
Alter, Mittelwert, Jahre, (SD)	67.7 (14.4)	65.6 (14.4)	68.8 (14.4)
Frauen, n (%)	59 (40,7%)	19 (38.8%)	40 (41.7%)
Afroamerikanisch, n (%)	1 (0.7%)	0 (0%)	1 (1%)
Komorbiditäten			
Herzinsuffizienz, n (%)	101 (69.7%)	34 (69.4%)	67 (69.8%)
Diabetes mellitus, n (%)	42 (29%)	12 (24.5%)	30 (31.3%)
Hypertonus, n (%)	118 (81.4%)	40 (81.6%)	78 (81.3%)
KHK, n (%)	44 (30.3%)	17(34.7%)	27(28.1%)
PAVK, n (%)	21 (14.5%)	9 (18.4%)	12(12.5%)
ZVE, n (%)	13 (9%)	4(8.2%)	9(9.4%)
CNI ≥ KDOQI Stadium III bei Einschluss, n (%)	38 (26.2%)	17(34.7%)	21(21.9%)
Nierenparameter bei Einschluss			
Serum Kreatinin baseline, median, umol/L (IQR)	87 (69-105.5)	89 (68.5-121.5)	84.5 (69.3-100)
Serum Kreatinin bei Einschluss, median, umol/L (IQR)	202 (157.5-263.5)	225 (170-299)*	188.5 (154.3-245.5)
Serum Harnstoff/Serum Kreatinin Ratio (IQR), median	81.9 (57.2-100.4)	87.8 (57.4-102.2)	81.2 (56.3-100)
FeNa, Median,% (IQR)	0.9 (0.3-2.2)	0.7(0.2-2.1)	1(0.3-2.6)
FeBUN, median, % (IQR)	24.9 (15.4-43.3)	23.9(12.8-44.5)	25.1(16.1-41)
NGAL bei Einschluss, median, ug/L (IQR)	95.4 (37.6-362.2)	248.2 (78-1010.6)**	68.3 (26.9-214)
NGAL/Kratinin bei Einschluss, median, ug/g (IQR)	115.7 (35.9-370.9)	235.4 (103.8-900.6)***	71.8 (28-220.7)

*Tabelle 9: Klinischer Verlauf nach Einschluss. CNI-chronische Niereninsuffizienz. GFR(glomeruläre Filtrationsrate) für CNI Stadium wurde nach der Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)-Formel berechnet. KHK-koronare Herzerkrankung, PAVK-periphere arterielle Verschlusskrankheit, ZVE-zerebrovaskuläre Erkrankungen. IQR-Interquartilabstand, FeNa-fraktionelle Natrium Exkretion, FeBUN-fraktionelle Harnstoff Exkretion. *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.01, zwischen Patientengruppen mit - und ohne Endpunkt, berechnet mit Student-t-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.*

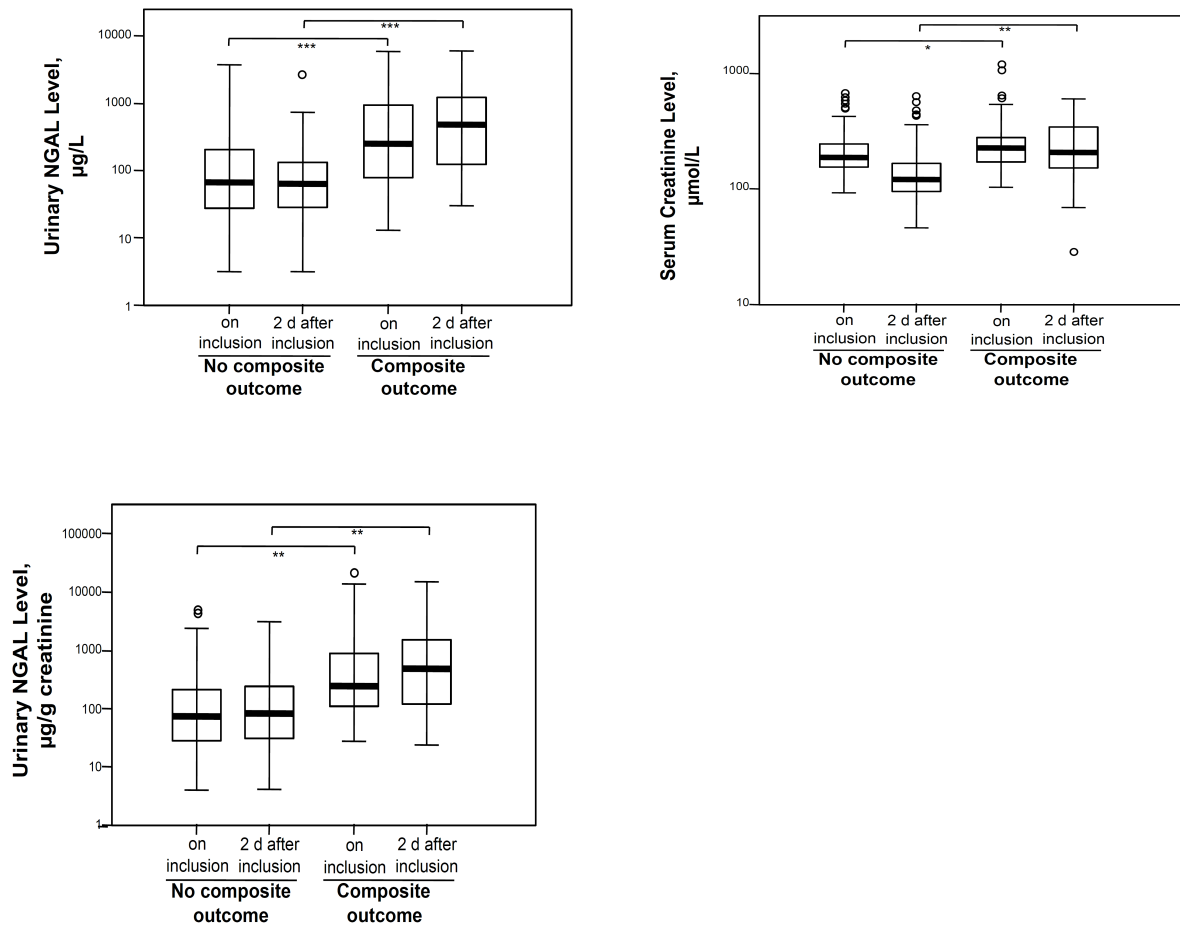


Abbildung 7. NGAL im Urin, Serum Kreatinin und NGAL/Kreatinin Ratio (beide im Urin) zur Prognoseabschätzung. Biomarker sind auf einer log₁₀ Skala aufgetragen. Die Boxen zeigen den Median sowie die untere und obere Quartile. Die Begrenzung oberhalb und unterhalb der Boxen kennzeichnet Daten innerhalb des 1.5 Interquartil-Abstandes der log₁₀ transformierten Biomarker-Spiegel von der oberen bzw. unteren Quartile. Kreise zeigen Ausreißer. * $p < 0.05$; ** < 0.01 ; *** < 0.001 .

4.2.5a Prognose (kombinierter Endpunkt: RIFLE-Stufe-Erhöhung, Dialyse, Tod) mittels herkömmlicher Parameter am ersten Tag

Das Serum Kreatinin war bei Patienten mit kombiniertem Endpunkt höher als bei anderen Patienten. Die Treffsicherheit gemessen an der AUC-ROC (95% Konfidenz-Intervall) für Serum Kreatinin betrug 0.61 (0.51-0.71); $p < 0.05$. RIFLE-Stufe sagte eine ungünstige Prognose nicht vorher (AUC-ROC 0.51).

4.2.5b Prognose (kombinierter Endpunkt: RIFLE-Stufe-Erhöhung, Dialyse, Tod) mittels uNGAL am ersten Tag

NGAL im Urin bei Einschluss und NGAL/Kreatinin (beide gemessen im Urin) waren bei Patienten mit kombiniertem Endpunkt ebenfalls höher als bei anderen Patienten. Die Vorhersagesicherheiten am Einschlusstag, gemessen an der AUC-ROC (95% Konfidenz-Intervalle) betragen für NGAL im Urin 0.71 und für NGAL/Kreatinin (im Urin) 0.71 (KI (Konfidenzintervall)=0.62–0.78, $p < 0.001$). Beide AUC-ROC waren tendenziell, aber nicht signifikant besser als Kreatinin ($p = 0.067$).

Die Patienten wurden in vier Gruppen je nach NGAL-Wert im Urin unterteilt: <47 $\mu\text{g/L}$; 47-104 $\mu\text{g/L}$, 104-426 $\mu\text{g/L}$ und >426 $\mu\text{g/L}$. Diese Cut-Off-Werte entsprachen der 60., 75. und 90. Perzentile der NGAL-Spiegel im Urin von über 1600 unselektierten Rettungsstellenpatienten (⁶¹). Es zeigte sich, dass mit ansteigenden NGAL-Werten der Anteil von Patienten mit schlechtem klinischem Verlauf progressiv zunahm (Abbildung 8).

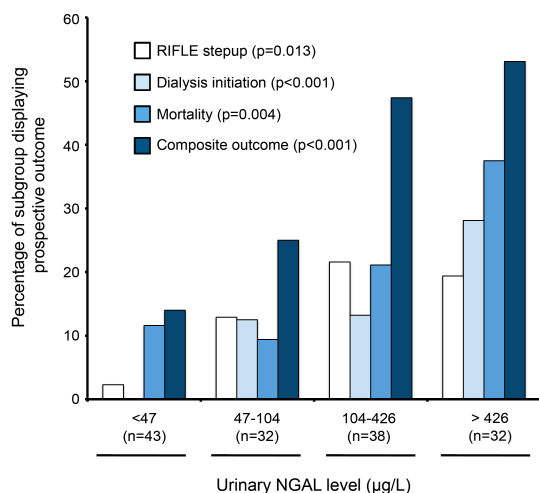


Abbildung 8: NGAL im Urin und Endpunkte. Die Patienten wurden nach NGAL-Spiegel bei Einschluss stratifiziert, Die Abbildung zeigt den Anteil der Patientengruppe, die einen Endpunkt erreicht. Weiss-Erhöhung der RIFLE-Stufe, hell-blau-Dialyse-Beginn, blau-Mortalität und dunkel-blau-kombinierter Endpunkt.

4.2.7 Prognose mittels serieller uNGAL-Bestimmung

Von 50 Patienten mit $\text{NGAL} > 104$ $\mu\text{g/L}$ bei Einschluss hatten nach zwei Tagen 38 Patienten weiterhin einen NGAL-Wert > 104 $\mu\text{g/L}$, bei 12 Patienten war der Wert unter

104 ug/L gesunken. 22 von 38 Patienten (58%) mit persistierend hohen uNGAL-Werten erreichten den kombinierten Endpunkt, dagegen nur 2 der 12 Patienten mit passagerem NGAL-Anstieg (17%). Die uNGAL-Persistenz sagte somit einen schlechteren Verlauf vorher ($p < 0.05$) (Tabelle 10a und 10b).

Charakteristika	Alle Patienten	Klinischer Verlauf nach Einschluss	
		Kombinierter Endpunkt (n=49)	Endpunkt nicht erreicht (n=94)
Entwicklung der Nierenparametern nach Einschluss			
Serum Kreatinin (median) 2 Tage nach Einschluss, umol/L (IQR)	148 (102-242)	205 (149-367)*	122 (95-169)
max Serum Kreatinin (median) innerhalb von 7 Tagen, umol/L (IQR)	190 (134-300)	273 (205-436)**	159 (127-233)
NGAL 2 Tage nach Einschluss (median), ug/L, (IQR)	102 (35-327)	474 (120-1251)**	64 (27-139)

Tabelle 10a: Entwicklung der Nierenparameter nach Einschluss. IQR= Interquartilabstand. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, zwischen Patientengruppen mit und ohne Endpunkt, berechnet mit Student-t-test bzw. chi-Quadrat-Test.

Charakteristika	Alle Patienten	Nierenversagen bei Einschluss		
		Intrinsisch n=75	Prärenal n=32	Unklassifiziert n=38
Entwicklung der Nierenparameter nach Einschluss				
Serum Kreatinin (median) 2 Tage nach Einschluss, umol/L (IQR)	148 (102-242)	199 (139-389)*	117 (88-152)	111 (84-164)
max Serum Kreatinin (median) innerhalb von 7 Tagen, umol/L (IQR)	190 (134-300)	277 (191-423)*	129 (114-163)	154 (126-228)
NGAL (median) 2 Tage nach Einschluss, ug/L, (IQR)	102 (35-327)	187 (99-892)**	22 (10-92)	41 (29-136)

Tabelle 10b: Entwicklung der Nierenparameter nach Einschluss. IQR-Interquartilabstand. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, zwischen Patientengruppen mit intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen, berechnet mit Student-t-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.

Differenzialdiagnose und Prognose waren nicht unabhängig voneinander: 38 Patienten mit einem intrarenalen Nierenversagen (50,7%) erreichten einen kombinierten Endpunkt (Nierenfunktionsverschlechterung mit Erhöhung der RIFLE-Stufe, Notwendigkeit der Nierenersatztherapie oder Mortalität). In der Patientengruppe mit prärenalem Nierenversagen wurden die Endpunkte lediglich bei 2 Patienten erreicht (6,3%), ($p < 0.001$) (Tabelle 11).

Charakteristika	Alle Patienten	Nierenversagen beim Einschluss		
		Intrinsisch n=75	Prärenale n=32	Unklassifiziert n=78
Endpunkte				
Erhöhung der RIFLE-Stufe	19 (13.4%)	14 (19.4%)**	0 (0%)	5 (13.2%)
Beginn der Nierenersatztherapie, n (%)	18 (12.4%)	14 (18.7%)*	1(3.1%)	3 (7.9%)
Mortalität, n (%)	28 (19.3%)	23 (30.7%)**	1 (3.1%)	4 (10.5%)
Kombinierter Endpunkt (ungünstiger klinischer Verlauf), n (%)	49 (3.8%)	38 (50.7%)***	2 (6.3%)	9 (23.7%)

Tabelle 11: Endpunkte nach Einschluss. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ zwischen Patientengruppen mit intrinsisch renalem und prärenalem Nierenversagen, berechnet mit Student-t-Test bzw. Chi-Quadrat-Test.

Mithilfe einer logistischen Regression wurde ein Vorhersagemodell konstruiert (Abbildung 9). In einem konventionellen Modell wurden demographische Daten, Serum Kreatinin und RIFLE-Stufe beim Einschluss in die Studie berücksichtigt. Davon gingen ein Alter unter 70 Jahre und ein Serum-Kreatinin-Wert über 205 $\mu\text{mol/L}$ als signifikante Kovariaten in das Prädiktionsmodell ein. Wurden die NGAL-Werte im Urin hinzugenommen, so gewann das Modell signifikant an Aussagekraft ($p < 0.001$). Die Aussagekraft wurde an drei Parametern gemessen: R^2 , AUC-ROC und diagnostische Genauigkeit. Diese Parameter stiegen nach Hinzufügen von NGAL: R^2 von 0.093 auf 0.215. AUC-ROC von 0.65 auf 0.74 und die diagnostische Genauigkeit von 68.3% auf 74.5%.

Konventionelles Modell

Parameter	WaldScore	P Value	Odds ratio	R ²	AUC-ROC	Diagnostische Genauigkeit
Alter >70 Jahre	3.3	0.068	0.5(0.25-1.1)	0.093	0.65(0.56-0.75)	68.30%
sKreatinin >205 umol/L	6.3	0.012	2.5 (1.2-5.2)			

Biomarker Modell

Parameter	WaldScore	P Value	Odds ratio	R ²	AUC-ROC	Diagnostische Genauigkeit
Alter >70 Jahre	3	0.083	0.5(0.2-1.1)	0.215	0.74(0.64-0.83)	74.50%
sKreatinin >205 umol/L	4.6	0.031	2.3(1.1-4.9)			
uNGAL >104 ug/L	13.3	<0.001	4.2(1.9-9.0)			

Abbildung 9: Modelle der multiplen logistischen Regression für die Prädiktion ungünstiger klinischer Verläufe (Erhöhung der RIFLE-Stufe, Dialyse und Tod). AUC-ROC- area under the receiver-operating characteristic curve. In Klammern sind 95% der Konfidenz-Intervalle. Wald-Score, p-Value sind Parameter für die Beschreibung von Kovariatenbeitrag zum Modell. R², AUC-ROC und diagnostische Genauigkeit spiegeln die Gesamtleistung des Modells wider.

Patienten wurden nach RIFLE-Stufe und NGAL-Spiegel stratifiziert (Abbildung 10). Patienten in der RIFLE-I-Stufe mit NGAL-Spiegeln über 104 ug/L hatten eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit NGAL-Werten bis 104 ug/L (p= 0.001). In der RIFLE-R- und -F- Stufe hatten die Patienten mit hohem NGAL tendenziell eine schlechtere Prognose, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

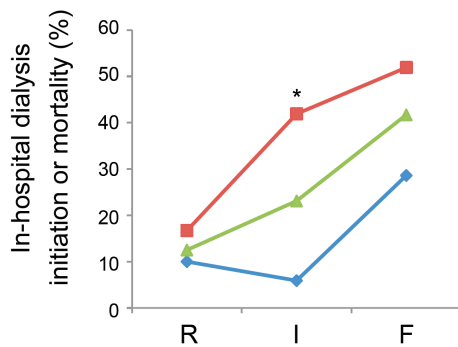


Abbildung 10: Patientenstratifizierung nach RIFLE-Stufen und NGAL (Cutoff 104 ug/L) Endpunkt besteht aus Dialyse und Mortalität. R-risk, I-Injury, F-Failure. Rot-NGAL>104 ug/L; grün-alle Patienten; blau-NGAL≤104 ug/L. * p= 0.05 vs NGAL ≤ 104 ug/L.

In einer sekundären Analyse wurde die Aussagekraft von NGAL zur prospektiven Unterscheidung eines transienten von einem anhaltenden Nierenversagen untersucht. Dafür wurden multivariate logistische Regressionsmodelle zur Vorhersage eines protrahierten Nierenversagens (definiert als Nierenversagen nach RIFLE-Kriterien für länger als 3 Tage) entwickelt (Abbildung 11). Ein konventionelles Prädiktionsmodell wurde mit einem NGAL-assistierten Prädiktionsmodell verglichen. Im konventionellen Modell, in das demographische Daten, Komorbiditäten und Laborparameter eingingen, war die RIFLE-Stufe der einzige signifikante Prädiktor eines protrahierten Nierenversagens. Wurde NGAL zum konventionellen Modell hinzugefügt (NGAL-assistiertes Modell) verbesserte sich die prognostische Aussagekraft des Modells signifikant ($p < 0.001$). Auch R^2 , AUC-ROC und diagnostische Sicherheit verbesserten sich.

Konventionelles Modell

Parameter	WaldScore	P Value	Odds ratio	R ²	AUC-ROC	Diagnostische Genauigkeit
RIFLE-Stufe	10.8	0.001	2.4 (1.4-4.1)	0.112	0.75(0.66-0.74)	71.7%

Biomarker Modell

Parameter	WaldScore	P Value	Odds ratio	R ²	AUC-ROC	Diagnostische Genauigkeit
RIFLE-Stufe	8.8	0.003	2.3 (1.3-4)	0.211	0.75(0.66-0.84)	73.10%
uNGAL >104 ug/L	10.3	0.001	3.9 (1.7-9.1)			

Abbildung 11: Modelle der multiplen logistischen Regression für die Prädiktion eines protrahierten Nierenversagens (anhaltende (>3 Tage) Erhöhung der RIFLE-Stufe). Beide Modelle wurde nach Geschlecht, bekannter chronischer Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz, vaskulären Erkrankungen, Hypertonus, Diabetes und Kreatinin bei Einschluss angepasst. In Klammern sind 95% der Konfidenz-Intervalle. AUC-ROC= area under the receiver-operating characteristic curve, Wald-Score, p-Value sind Parameter für die Beschreibung von Kovariatenbeitrag zum Modell. R², AUC-ROC und diagnostische Genauigkeit spiegeln die Gesamtleistung des Modells wider.

5. Diskussion

Die Arbeit beschäftigt sich mit NGAL als Biomarker für ein akutes intrinsisch-renales Nierenversagen. Dabei sollten zwei Fragen geklärt werden:

1. Ist der kommerziell verfügbare Test für NGAL ein zuverlässiges Maß für die pathophysiologisch relevante monomere Form von NGAL? Oder werden die Ergebnisse durch nicht renal produzierte Formen von NGAL verfälscht?
2. Welche Aussagekraft haben erhöhte NGAL-Werte im Urin bei hospitalisierten Patienten, die bereits ein nach RIFLE-Kriterien etabliertes Nierenversagen aufweisen?

Es gibt verschiedenen Messmethoden um NGAL zu erfassen: RIA (⁶⁶), Western Blot (⁶⁷), ELISA (⁶⁸, ⁶⁹) sowie kommerzielle Systeme, die auf Sandwich Verfahren beruhen (z.B. die Architect platform (Grenier FC et al, 2010 (⁶²)). In verschiedenen Studien

wurden unterschiedliche Methoden benutzt. Das erklärt unterschiedliche Ergebnisse; beispielsweise war in manchen Studien bei septischen Patienten mit Nierenversagen der NGAL Spiegel im Urin signifikant höher als bei nicht septischen Patienten mit Nierenversagen (Cai L et al, 2010 ⁽³⁸⁾). Daraus ergibt sich die Frage, ob alle verwendeten Messmethoden zuverlässig Patienten mit Nierenversagen identifizieren.

In dieser Arbeit wurde NGAL im Urin parallel mittels ARCHITECT Plattform (Abbott Diagnostics Inc., Abbott Park, IL) und mittels Western Blot gemessen, und die diagnostische Wertigkeit beider Methoden wurde miteinander verglichen. Im Western Blot lässt sich die monomere, nierenspezifische Form eindeutig identifizieren. Es war unklar, ob die diagnostische Aussagekraft der Abbott Plattform durch die heterodimere Form verfälscht wird.

Es wurden die Urine von über 1200 Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen parallel mit beiden Tests untersucht. Die Daten zeigen in dieser großen, heterogenen Gruppe von Patienten dreier Zentren eine sehr enge Korrelation zwischen den Testergebnissen beider Untersuchungen (Pearson correlation 0.93, $p < 0.0001$). Die differentialdiagnostische Aussagekraft beider Untersuchungsmethoden war nahezu identisch: die AUC-ROC für die Feststellung von intrinsisch renalem akutem Nierenversagen mittels der kommerziellen Abbott-Methode betrug (0.81, KI 0.76-0.86), für den Western Blots betrug sie (0.81, KI 0.75-0.86). Damit ist gezeigt, dass sowohl mit der Forschungsmethode (Western Blot) als auch mit dem kommerziellen Test von Abbott die pathophysiologisch relevanten Formen von NGAL bestimmt werden. Patienten mit Harnwegsinfekten und Patienten mit Sepsis wurden in die Studie eingeschlossen, um eine auf eine breite Patientenpopulation anwendbare Aussage über die diagnostische Wertigkeit von NGAL zu erhalten. Jedoch war die Studie nicht darauf angelegt, separate Analysen in Patienten mit oder ohne diese Komorbiditäten durchzuführen. Somit ist eine abschließende Einschätzung zum Einfluss dieser Komorbiditäten auf die diagnostische Wertigkeit von NGAL auf der Basis dieser Studie nicht möglich.

Frühere Studien zeigten, dass NGAL-Bestimmung für die Frühdiagnose bei akutem Nierenversagen nützlich ist. Allerdings variierte die diagnostische Genauigkeit erheblich, weil diese Studien an kleineren und heterogenen Patientengruppen durchgeführt wurden. So schwankte die AUC-ROC in verschiedenen Studien zwischen

0.61 und 0.96 (Wagener G et al, 2006 ⁽⁴⁸⁾ und 2008 ⁽⁵²⁾, Haase-Fielitz A et al, 2009 ⁽⁵³⁾, Haase-Fielitz A et al, 2009 ⁽⁵⁴⁾, Haase M et al 2009 ⁽⁵⁵⁾). Diese Unterschiede können von mehreren Faktoren verursacht sein: Alter, Nebenerkrankungen, vorbestehende chronische Niereninsuffizienz, Operationszeit bei den kardiochirurgischen Patienten (Devarjan P. 2008 ⁽⁴⁹⁾). Die diagnostische Sicherheit von NGAL variierte abhängig von der vorbestehenden Nierenfunktion, sie war am besten bei normaler renaler Funktion präoperativ (McIlroy DR et al 2010 ⁽⁵⁰⁾).

Bislang fehlte eine Studie an Patienten mit etabliertem Nierenversagen zur Differenzierung zwischen intrarenalen und prärenalen Ursachen. Da NGAL in Nierenzellen bei Zellschädigung produziert wird, sollte es potenziell zwischen diesen Formen unterscheiden können.

Dazu wurde in dieser Arbeit eine Kohorte von 161 Patienten untersucht. NGAL im Urin wurde am Tag der Diagnose eines Nierenversagens nach RIFLE Kriterien und nochmals zwei Tage später bestimmt. Es zeigte sich, dass die Werte bei intrarenalem Nierenversagen wesentlich höher waren als bei prärenalem Nierenversagen. NGAL Werte über 104 ng/mL bei Einschluss sprachen mit großer Wahrscheinlichkeit für ein intrinsisches renales Nierenversagen, Werte unter 47 ng/mL mit großer Wahrscheinlichkeit für eine funktionelle, „prärenale“ Ursache.

Die Aussagekraft war größer als diejenige der etablierten differentialdiagnostischen Methoden. Die Fraktionelle Natrium-Exkretion unterschied in unserer Kohorte nicht statistisch signifikant zwischen renalem und prärenalem Nierenversagen, vermutlich wegen der hohen Prävalenz von chronischer Herzinsuffizienz (69,7%) und arterieller Hypertonie (81,4%) mit entsprechender diuretischer Therapie. Auch die fraktionelle Harnstoff-Exkretion hatte eine nur marginale Aussagekraft.

Diese mäßige Aussagekraft etablierter Parameter stimmt mit einem systematischen Review von 27 Studien aus dem Jahr 2006 ⁽⁷⁰⁾ überein, in dem den genannten Indizes und auch dem Urinsediment sehr variable Ergebnisse zugeschrieben werden und demzufolge nur wenig zur Differenzierung zwischen intrarenalem und prärenalem Nierenversagen beitragen können.

Um so wichtiger sind die eindeutigen Ergebnisse in Hinblick auf NGAL, die hier zum ersten Mal erhoben werden. Der Befund ist sowohl mit den dargestellten präklinischen Daten konsistent als auch mit den dargestellten Studien zu frühen Diagnose von Nierenversagen bei Risikogruppen (Herzoperation). Es ist einschränkend anzumerken, dass es sich um eine monozentrische Studie handelt, die einer unabhängigen Bestätigung bedarf. Die Daten wurden jedoch mittlerweile in einer Subgruppenanalyse einer multizentrischen Studie (Nickolas et al., 2012 ⁽⁶¹⁾) in ihren Kernaussagen bestätigt. Eine weitere Limitation dieser Studie ist, dass zwischen intrarenalem und prärenalem Nierenversagen anhand klinischer Information und serieller Kreatinin-Messungen differenziert wurde, es lagen also in der Regel keine Biopsieergebnisse vor. Deshalb verblieb eine Gruppe von „unklassifizierbaren“ Patienten, die wegen diagnostischer Unsicherheit nicht für die Endanalyse herangezogen werden konnten.

Intrinsisch renales Nierenversagen hat eine schlechtere Prognose als prärenales Nierenversagen. Es verwundert daher nicht, dass hohe uNGAL-Werte auch mit einer schlechten Prognose korrelieren, zu einem Zeitpunkt, an dem die Retentionsparameter bei schwerem Nierenversagen oft noch nicht ihr Maximum erreicht haben, bei passageren Formen noch nicht wieder wesentlich abgefallen sind. Auch dieser Befund war anhand der tierexperimentellen Daten zu erwarten, und er bestätigt den Befund von Yang et al, 2010 ⁽⁵⁷⁾. Besonders zuverlässig wurden die Vorhersagen durch erneute NGAL-Bestimmung nach zwei Tagen. Selbst bei nur einmaliger Bestimmung von NGAL war ein Wert über 104 ng/mL in einem Modell, das das Alter und den Kreatinin Wert berücksichtigt, unabhängig mit der Prognose assoziiert. Diese Befunde sollten unabhängig repliziert werden. Sie könnten das Management von Patienten mit Nierenversagen wesentlich beeinflussen (Dauer der Überwachungsnotwendigkeit / Krankenhausbehandlung, Entscheidung zur Dialyse).

Der Hauptbefund dieser Arbeit – hohe NGAL Werte im Urin bei akutem Nierenversagen weisen mit hoher Zuverlässigkeit auf eine intrarenale Ursache und hin – könnte durch eine ähnliche Studie, bei der Biopsien gewonnen werden weiter erhärtet werden. Dies wäre beispielsweise bei Patienten nach Nierentransplantation möglich, bei denen bei Funktionseinschränkungen niederschwellig biopsiert werden muss. Wenn sich der enge Zusammenhang bestätigt, könnte bei niedrigen NGAL Werten im Urin in Zukunft ggf. auf einen Teil der Biopsien verzichtet werden.

Ob und wie Biomarker wie NGAL tatsächlich dazu beitragen können, die Behandlung von Patienten zu verbessern, also klinische Endpunkte wie Sterblichkeit, Behandlungsdauer, Komplikationsraten beeinflussen, muss in künftigen Studien geklärt werden.

6. Zusammenfassung

1. In einer multizentrischen, prospektiven, verblindeten Studie an 1635 unausgewählten Patienten, die über Rettungsstellen hospitalisiert wurden, wurde eine kommerzielle Bestimmung von NGAL im Urin (Abbott-Plattform; unterscheidet nicht zwischen verschiedenen NGAL-Formen) mit einem Western Blot auf die monomere, nierenspezifische Form von NGAL verglichen. Die Ergebnisse beider Messmethoden korrelierten sehr eng (Pearsons Korrelation Koeffizient 0.93, $p < 0.0001$), und beide Messmethoden zeigten eine vergleichbare Zuverlässigkeit für die Diagnostik des akuten intrinsischen Nierenversagens (AUC-ROC = 0.81).

In einer monozentrischen prospektiven Beobachtungsstudie wurden NGAL-Spiegel im Urin (uNGAL) von 145 Patienten untersucht, die während eines stationären Krankenhausaufenthaltes ein akutes Nierenversagen entwickelten. Die Differenzierung zwischen renalen und prärenalen Ursachen wurde anhand aller am Ende der Behandlung vorliegenden Unterlagen vorgenommen. 75 Patienten hatten intrinsisches akutes Nierenversagen, 32 prärenales, 38 waren klinisch nicht klassifizierbar. NGAL im Urin am Tag der Diagnosestellung war hilfreich in der Differenzierung: Werte über 104 $\mu\text{g/L}$ zeigten ein intrinsisches Nierenversagen an (Positive Likelihood Ratio 5.97), während NGAL-Werte unter 47 $\mu\text{g/L}$ die Diagnose eines renalen Nierenversagens unwahrscheinlich machten (negative Likelihood Ratio 0.2). Die diagnostische Sicherheit gemessen an der AUC (area under the receiver-operating characteristic curve) betrug 0.87.

Mithilfe einer logistischen Regressionsanalyse wurden Vorhersagemodelle für einen zusammengesetzten Endpunkt aus RIFLE Progression, Dialylenotwendigkeit oder Tod konstruiert. Dabei zeigte sich, dass ein konventionelles Prädiktionsmodell durch Hinzufügen des NGAL-Parameters signifikant verbessert wurde ($p < 0.001$). Die

diagnostische Genauigkeit verbessert sich von 68% auf 75%, die AUC-ROC von 0,65 auf 0,74.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass NGAL-Messungen im klinischen Alltag zur Diagnostik und Differenzierung von akutem Nierenversagen hilfreich sein könnten. Dabei scheint der NGAL-Spiegel im Urin Nierenschädigungen früher und empfindlicher als Serum-Kreatinin zu erfassen; er verbessert die frühzeitige Differentialdiagnose zwischen intrarenalem und prärenalem Nierenversagen; und er trägt zur frühzeitigen Prognoseabschätzung bei akuter Nierenschädigung bei.

Literatur

- ¹ Mehta RL, Kellum JA, Shah SV et al. Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care* 2007; 11(2):R31
- ² Nash K, Hafeez A, Hou S Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002 May;39(5):930-6
- ³ Uchino S, Kellum JA, Bellomo R et al, Acute renal failure in critical ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; Aug 17;294(7):813-8
- ⁴ Rehberg PB. Studies on kidney function. The rate of filtration and reabsorption in the human kidney. *Biochem J* 1926; 20(3):447-460
- ⁵ Delanghe JR, Speeckaert MM Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? *NDT plus* (2011) 0:1-4 doi: 10.1093/ndtplus/sfq211
- ⁶ Jaffe M Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem* 1886; 10:391-400
- ⁷ Wuyts B, Bernard D, Van den Noortgate et al, Reevaluation of formulas for predicting creatinine clearance in adults and children, using compensated creatinine methods. *Clin Chem* 2003;Jun; 49(6 Pt 1):1011-4
- ⁸ Jo SK, Rosner MH, Okusa MD. Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007 Mar;2 (2):356-65
- ⁹ Devarajan P. Emerging biomarkers of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 2007; 156:203-12
- ¹⁰ Lassnigg A, Schidlin D, Mouhieddine M, et al. Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jun; 15 (6): 1597-605
- ¹¹ Dent CL, Ma Q, Dastrala S et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care* 2007; 11(6):R127
- ¹² Bosch JP, Saccaggi A, Lauer A, Ronco C, Belledonne M, Glabman S. Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *The Am J Med.* 1983 Dec; 75(6): 943-50

-
- ¹³ Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004 Aug; 8(4):R204-12
- ¹⁴ Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005, Nov; 16(11):3365-70
- ¹⁵ Gruberg L, Mintz GS, Mehran R et al. The prognostic implications of further renal function deterioration within 48 h of interventional coronary procedures in patients with pre-existent chronic renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Nov1; 36(5):1542-8
- ¹⁶ Levy MM, Macias WL, Vincent JL et al. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2005 Oct; 33(10):2194-201
- ¹⁷ McCullough PA, Soman SS. Contrast-induced nephropathy. *Crit Care Clin*. 2005 Apr; 21(2):261-80
- ¹⁸ Praught ML, Shlipak MG. Are small changes in serum creatinine an important risk factor? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 May;14(3):265-70
- ¹⁹ Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*. 1996 Sep; 50(3):811-8
- ²⁰ Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Jul; 3(4):962-7
- ²¹ Miller TR, Anderson RJ, Linas SL, et al. Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study. *Ann Intern Med*. 1978 Jul; 89(1):47-50
- ²² Espinel CH, Gregory AW. Differential diagnosis of acute renal failure. *Clin. Nephrol*. 1980 Feb;13(2):73-7
- ²³ Steiner RW. Interpreting the fractional excretion of sodium. *Am J Med*. 1984 Oct;77(4):699-702
- ²⁴ Diamond JR, Yoburn DC. Nonoliguric acute renal failure associated with a low fractional excretion of sodium. *Ann Intern Med*. 1982 May;96(5):597-600
- ²⁵ Darmon M, Vincent F, Dellamonica J et al, Diagnostic performance of fractional excretion of urea in the evaluation of critically ill patients with acute kidney injury: a multicenter cohort study. *Critical Care* 2011 Jul 27;15(4):R178

-
- ²⁶ Perazella MA, Coca SG, Kanbay M, Brewster UC, Parikh CR. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3(6):1615-9
- ²⁷ Dixon BS, Anderson RJ. Nonoliguric acute renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1985 Aug;6(2):71-80
- ²⁸ Eknayan G. Letter: Renal disorders in hepatic failure. *Br. Med. J*. 1974 Jun 22;2(5920):670
- ²⁹ Feinfeld DA, Bargouthi H, Niaz Q, Carvounis CP. Massive and disproportionate elevation of blood urea nitrogen in acute azotemia. *Int Urol Nephrol*. 2002;34(1):143-5
- ³⁰ Chalasani N, Clark WS, Wilcox CM. Blood urea nitrogen to creatinine concentration in gastrointestinal bleeding: a reappraisal. *Am J Gastroenterol*. 1997 Oct;92(10):1796-9
- ³¹ Parikh CR, Coca SG. Acute kidney injury: defining prerenal azotemia in clinical practice and research. *Nat Rev Nephrol*. 2010 Nov;6(11):641-2
- ³² Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R. A multi-centre evaluation of the RIFLE-criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Apr;23(4):1203-10
- ³³ Paragas N, Qui, A, Zhang Q, et al. The NGAL reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med*. 2011 Feb; 17(2): 216–22
- ³⁴ Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J*. 1996 Aug 15;318(Pt 1):1-14
- ³⁵ Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical biomarkers of disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18;1482(1-2):298-307
- ³⁶ Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002 Nov; 10(5):1033-43
- ³⁷ Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Boregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol Chem*. 1993 May 15;268(14):10425-32
- ³⁸ Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Dec;5(12):2229-35
- ³⁹ Yilmaz A, Sevketoglu E, Gedikbasi A, et al. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol*. 2009 Dec;24(12):2387-92

-
- ⁴⁰ Supravekin S, Zang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003 May;63(5):1714-24
- ⁴¹ Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Oct;14(10):2534-43
- ⁴² Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Jul;15(4):442-9
- ⁴³ Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):407-13
- ⁴⁴ Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec;15(12):3073-82
- ⁴⁵ Bennett M, Dent CL, Ma Q et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 May;3(3):665-73
- ⁴⁶ Mishra J, Dent C, Tarabishi R et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury following cardiac surgery. *Lancet* 2005 Apr 2-8;365(9466):1231-8
- ⁴⁷ Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J et al, Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med*. 2008 Jun 3;148(11):810-9
- ⁴⁸ Wagener G, Jan M, Kim M, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006 Sep;105(3):485-91
- ⁴⁹ Devarjan P. NGAL in acute kidney injury: from serendipity to utility. *Am J Kidney Dis*. 2008 Sep;52(3):395-9
- ⁵⁰ McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Feb;5(2):211-9
- ⁵¹ Kumpers P, Hafer C, Lukasz A et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin at inception of renal replacement therapy predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Crit Care*. 2010;14(1):R9
- ⁵² Wagener G, Gubitosa G, Wang S, Borregaard N, Kim M, Lee HT. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis*. 2008 Sep;52(3):425-33

-
- ⁵³ Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarjan P et al. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery-a prospective cohort study. *Crit Care Med*. 2009 Feb;37(2):553-60
- ⁵⁴ Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarjan P et al. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Nov;24(11):3349-54
- ⁵⁵ Haase M, Bellomo R, Devarjan P et al. Novel biomarkers early predict the severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults. *Ann Thorac Surg*. 2009 Jul;88(1):124-30
- ⁵⁶ Makris K, Markou N, Evodia E et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(1):79-82
- ⁵⁷ Yang HN, Boo CS, Kim MG, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: an independent predictor of adverse outcomes in acute kidney injury. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):501-9
- ⁵⁸ Siew ED, Ware LB, Gebretsadik T et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin moderately predicts acute kidney injury in critically ill adults. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug 20(8):1823-32
- ⁵⁹ Cruz DN, de Cal M, Garzotto F et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Int Care Med*. 2010 Mar;36(3):444-51
- ⁶⁰ Bagshaw SM, Bennett M, Haase M et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Int Care Med*. 2010 Mar;36(3): 452-61
- ⁶¹ Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: a multicenter prospective cohort study. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jan 17;59(3):246-55
- ⁶² Grenier FC, Ali S, Syed H, et al. Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: assay performance, specimen handling requirements and biological variability. *Clin Biochem*. 2010 Apr;43(6):615-20
- ⁶³ Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979 Sep;76(9):4350-4
- ⁶⁴ Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction

equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999 Mar 16;130(6):461-70

⁶⁵ DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988 Sep;44(3): 837–45

⁶⁶ Xu SY, Petersson CG, Carlson M, Venge P. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (NHL)- to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods.* 1994 May 16;171(2):245-52

⁶⁷ Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2004 May-Jun; 24(3):307-15

⁶⁸ Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregaard N. Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods.* 1996 Nov 13;198(2):155–64

⁶⁹ Bläser J, Triebel S, Tschesche H. A sandwich enzyme immunoassay for the determination of neutrophil lipocalin in body fluids. *Clin Chim Acta.* 1995 Mar 31;235(2): 137–45

⁷⁰ Bagshaw SM, Langenberg C, Bellomo R. Urinary biochemistry and microscopy in septic acute renal failure: a systematic review. *Am J Kidney Dis.* 2006 Nov;48(5):695-705

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Zeitschriften

1. Singer E, Strohm S, Göbel U, Bieringer M, Schmidt D, Schneider W, Kettritz R, Luft FC. Cushing's Disease, Hypertension, and Other Sequels. Hypertension. 2008 Dec;52(6):1001-5.
2. Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, Luft FC, Schmidt-Ott KM. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. Kidney Int. 2011 Aug;80(4):405-14.
3. Sise ME, Forster C, Singer E, Sola-Del Valle D, Hahn B, Schmidt-Ott KM, Barasch J, Nickolas TL. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin identifies unilateral and bilateral urinary tract obstruction. Nephrol Dial Transplant. 2011 Dec;26(12):4132-5.
4. Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P, Forster C, Singer E, Sise M, Elger A, Maarouf O, Sola-Del Valle DA, O'Rourke M, Sherman E, Lee P, Geara A, Imus P, Guddati A, Polland A, Rahman W, Elitok S, Malik N, Giglio J, El-Sayegh S, Devarajan P, Hebbar S, Saggi SJ, Hahn B, Kettritz R, Luft FC, Barasch J. Diagnostic and Prognostic Stratification in the Emergency Department Using Urinary Biomarkers of Nephron Damage: A Multicenter Prospective Cohort Study. J Am Coll Cardiol. 2012 Jan 17;59(3):246-55.
5. Singer E, Marko L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Müller DN, Budde K, Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. Acta Physiol 2013 (in press)

Poster

uNGAL identifies bacteremia secondary to urinary tract infection

Catherine S. Forster, Meghan E. Sise, David A Sola-Del Valle, Eugenia Singer, Kai Schmidt-Ott, Pietro A. Canetta, Jonathan M Barasch, and Thomas L. Nickolas
ASN Renal Week 2009, San Diego

Urine NGAL is a superior diagnostic marker of urinary obstruction than serum creatinine
Meghan Sise, Catherine Forster, Eugenia Singer, Melissa Laudano, Kai Schmidt-Ott, Jonathan Barasch, Thomas Nickolas.

World Congress of Nephrology, Mailand 2009

Test characteristics of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for differential diagnosis and risk stratification in patients with established acute kidney injury (AKI)

Eugenia Singer, Antje Elger, Saban Elitok, Ralph Kettritz, Thomas Nickolas, Jonathan Barasch, Friedrich C. Luft, Kai M. Schmidt-Ott

ASN Renal Week Denver 2010

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Eugenia Singer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipokalin (NGAL) als Biomarker zur Differenzialdiagnose und Prognoseabschätzung bei akutem Nierenversagen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

24.07.2012

Danksagung

Herrn Professor Dr. Kai M Schmidt-Ott möchte ich für die Betreuung dieser Promotion herzlich danken. Jederzeit gewährte er mir während dieser Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Seine Anregungen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen und ermöglichten die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Publikationen und Präsentationen.

Herrn Jonathan Barasch (M.D., Ph.D., Associate Professor of Medicine and Anatomy & Cell Biology an der Columbia University, College of Physicians and Surgeons) danke ich für die Möglichkeit, die in der vorliegenden Arbeit angewandte Forschungsmethoden zu erlernen. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern seines Forschungslabors, insbesondere Frau Catherine Forster und Meghan Sise für die Hilfe beim Erlernen neuer Methoden.

Herrn Oberarzt Dr. Saban Elitok vom Helios-Klinikum in Berlin-Buch danke ich für die Bekanntschaft mit meinem Doktorvater und seine hilfreiche Motivation.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Nephrologie und Hypertensiologie im Helios-Klinikum Berlin Buch für das gute Arbeitsklima und die schöne Atmosphäre, die mir in guter Erinnerung bleiben werden.

Außerdem danke ich meiner Mit-Doktorandin Frau Antje Elger für die unermüdliche, und kooperative Zusammenarbeit.

Dankbar anerkennen will ich die freundschaftliche technische Unterstützung von Herrn Dr. Max Werth.

Besonders bedanken will ich mich bei Herren Professor FC Luft und Professor R. Kettritz, die mein Interesse für Nephrologie erweckt haben, für ihre sehr hilfreichen Anregungen bei der klinischen Arbeit und für die konstruktiven und kritischen Anmerkungen zu den Publikationen.