

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II
Direktor: Prof. Dr. med. G. A. J. Riegger
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Arachidonsäurestoffwechselprodukte im Urin als Marker einer Abstoßungsreaktion bei Patienten nach Nierentransplantation

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Scherl

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Banas

2. Berichterstatter: PD Dr. Karl-Peter Ittner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2010

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Geschichte der Nierentransplantation	7
1.2 Abstoßung von Transplantatnieren	8
1.2.1 Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion	8
1.2.2 Diagnostik einer Abstoßungsreaktion	10
1.2.3 Häufigkeit und Verlauf von Abstoßungsreaktionen	12
1.2.4 Prävention und Therapie einer Abstoßungsreaktion	13
1.3 Eicosanoide	14
1.3.1 Der Arachidonsäurestoffwechsel	14
1.3.2 Eicosanoide und Abstoßung von transplantierten Nieren	15
1.4 Arachidonsäurestoffwechselprodukte als Abstoßungsmarker?	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	18
2.2 Verwendete Enzyme Immunoassay Kits und sonstige Materialien	19
2.3 Prinzip des Enzyme Immunoassay	19
2.4 Testen und Etablieren der Methode	21
2.5 Messung ausgewählter Arachidonsäurestoffwechselprodukte	24
2.5.1 12(S)-HETE	24
2.5.2 15(S)-HETE	26
2.5.3 Leukotrien B ₄	28
2.5.4 Leukotrien E ₄	31
2.5.5 Prostaglandin E Metaboliten	32
2.5.6 6-keto Prostaglandin F _{1α}	36
2.5.6.1 Aufreinigung	36
2.5.6.2 Messung	37
2.6 Messung der optischen Dichte	38
2.7 Datenverarbeitung	39
2.8 Erhebung der klinischen Daten	40

3 Ergebnisse	41
3.1 12(S)-HETE	41
3.1.1 Beziehung zu einer Abstoßung	41
3.1.2 Auswertung klinischer Daten	42
3.2 15(S)-HETE	46
3.2.1 Beziehung zu einer Abstoßung	46
3.2.2 Auswertung klinischer Daten	49
3.3 Leukotrien B ₄	50
3.3.1 Beziehung zu einer Abstoßung	50
3.3.2 Auswertung klinischer Daten	52
3.4 Leukotrien E ₄	53
3.4.1 Beziehung zu einer Abstoßung	53
3.4.2 Auswertung klinischer Daten	54
3.5 Prostaglandin E Metaboliten	56
3.5.1 Beziehung zu einer Abstoßung	56
3.5.2 Auswertung klinischer Daten	57
3.6 6-keto Prostaglandin F _{1α}	58
3.6.1 Beziehung zu einer Abstoßung	58
3.6.2 Auswertung klinischer Daten	59
4 Diskussion	60
4.1 Methodik	60
4.1.1 Patientenkollektiv und Proben	60
4.1.2 Messungen	61
4.2 Ergebnisse	62
4.2.1 12(S)-HETE	62
4.2.2 15(S)-HETE	63
4.2.3 Leukotrien B ₄	64
4.2.4 Leukotrien E ₄	65
4.2.5 Prostaglandin E Metaboliten	65
4.2.6 6-keto Prostaglandin F _{1α}	66
5 Zusammenfassung	67

6 Literaturverzeichnis	69
7 Abbildungsverzeichnis	77
8 Anhang	78
8.1 Materialien und Laborgeräte	78
8.2 Übersichtstabellen	80
8.3 Danksagung	81
8.4 Lebenslauf	82

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Nierentransplantation

Auf Grund des schlechten Überlebens von niereninsuffizienten Patienten gab es seit Beginn des 20. Jahrhunderts Versuche, Nieren zu transplantieren. Diese scheiterten jedoch allesamt an der Abwehrreaktion des Immunsystems. Die erste Nierentransplantation, die als erfolgreich bezeichnet werden kann, wurde am 23.12.1954 durch Dr. Joseph Murray in Boston/USA durchgeführt (Merrill 1956). Sie erfolgte in Form einer Lebendspende zwischen eineiigen Zwillingen und gilt als erste Organtransplantation mit Langzeiterfolg. Wegen der identischen Gewebsmerkmale kam es zu keiner Abstoßung. Aus diesem Grund wurde in der nachfolgenden Zeit ein besonderes Augenmerk auf die Unterdrückung der Abstoßungsreaktion gelegt. Hierbei kamen unter anderem Zytostatika und Bestrahlung zum Einsatz. Die ersten Erfolge bei der Verhinderung einer Abstoßung wurden in den 60er Jahren mit Azathioprin und Steroiden erzielt (Barry 2006). Während dieser Zeit konnten J. J. van Rood und Mitarbeiter in Leiden/Niederlande die entscheidende Bedeutung der HLA (Human Leucocyte Antigen) – Übereinstimmung von Spender und Empfänger bei Transplantationen nachweisen (van Rood 1969). Aus dieser Arbeitsgruppe entstand mit Eurotransplant die erste internationale Organisation für Organaustausch. Eurotransplant katalogisiert Spender und Empfänger auf Grundlage der HLA-Übereinstimmung und übernimmt die Koordination und Vermittlung von Organtransplantationen (van Rood, Freudenberg 1971).

Mit der Entwicklung weiterer immunsuppressiv wirksamer Medikamente wie Antilymphozytenglobulin und dem Calcineurininhibitor Cyclosporin in den darauf folgenden Jahrzehnten verbesserte sich das Transplantatüberleben weiter. Insbesondere die seit Mitte der 90er Jahre verwendeten modernen Kombinationstherapien haben zu einer deutlichen Verminderung von Abstoßungsreaktionen geführt (Sayegh 2004).

1.2 Abstoßung von Transplantatnieren

1.2.1 Pathophysiologie der Abstoßungsreaktion

Bei 10-15 % der transplantierten Nieren kommt es trotz immunsuppressiver Medikation innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation zu einer akuten Abstoßungsreaktion (Segoloni 2006). Die wesentlichen Komponenten einer Abstoßungsreaktion sind die körpereigene Immunabwehr und fremde Proteine des Spenders, wobei die MHC-Proteinkomplexe (MHC=major histocompatibility complex, entspricht den o.g. HLAs) hierbei die größte Rolle spielen. MHC-Komplexe werden in Klasse I und II unterschieden.

MHC-I-Komplexe befinden sich als Membranproteine auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers. Dadurch geben sich die Zellen als körpereigen zu erkennen. Fremde oder veränderte MHC-I-Komplexe werden von den T-Zell-Rezeptoren der zytotoxischen $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten erkannt. Über einen komplexen Signalweg kommt es schließlich zu einer gezielten Abtötung der fremden Zellen. MHC-II-Komplexe sind hingegen nur auf antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Langerhans-Zellen zu finden und haben hier die Aufgabe, ein vorher aufgenommenes Antigen zu präsentieren. $CD4^{+}$ -T-Lymphozyten können mit diesen MHC-II-Komplexen in Kontakt treten. Sie produzieren Interleukine, welche die B-Zellen zur Umwandlung in Antikörperproduzierende Plasmazellen veranlassen (Löffler 2007 [1]).

Bei einer Abstoßungsreaktion handelt es sich um eine immunologische Reaktion, die primär von T-Zellen vermittelt wird. Der Mechanismus ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Antigenpräsentierende Zellen des Spenders können von naiven alloreaktiven T-Zellen erkannt werden. Dies führt zu einer Aktivierung von $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten, welche daraufhin im Rahmen einer zellulären Immunantwort das Transplantat "angreifen". Diese direkte Erkennung erfolgt über T-Zell-Rezeptoren, die spezifisch sind für fremde MHC-Moleküle (Lechler 1982).

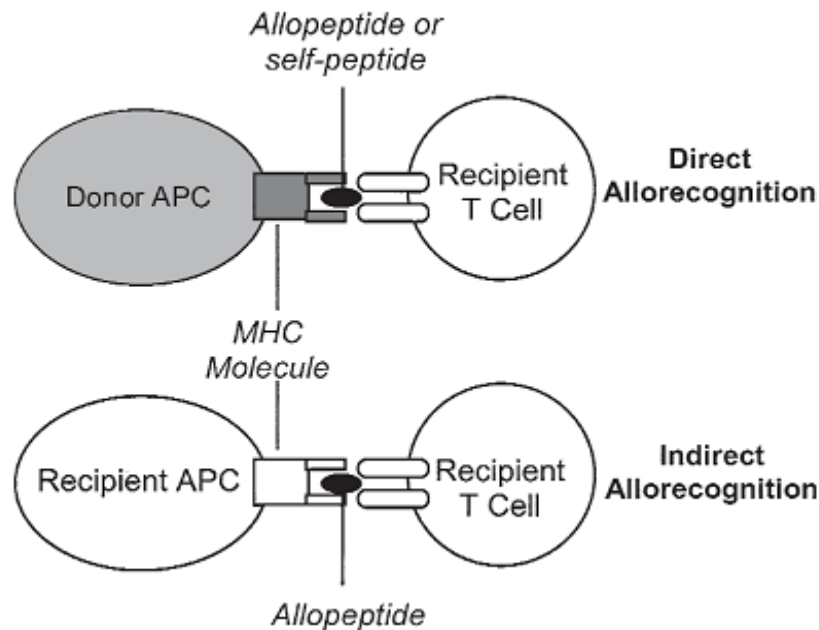


Abb. 1.1: Direkte und indirekte Erkennung fremder Peptide (Allopeptide) auf MHC-Komplexen durch T-Zellen des Empfängers (Recipient T Cell). Die Peptide werden entweder direkt auf Zellen des Spenders (Donor APC) oder indirekt auf antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers (Recipient APC) erkannt. (Runge 2006)

Ein weiterer Mechanismus ist die indirekte Erkennung: Allogene Proteine des Spenders werden von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers (z. B. Makrophagen) aufgenommen und zusammen mit eigenen MHC-Komplexen den $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert. Wie oben beschrieben, kommt es im weiteren Verlauf dieser humoralen Immunantwort zur Bildung von Alloantikörpern, die gegen das fremde Antigen gerichtet sind (Janeway 2002, Lechler 1982).

Für die akute Abstoßungsreaktion ist vorwiegend die direkte Erkennung verantwortlich (van Besouw 2005). Der indirekte Mechanismus ist maßgeblich an spät auftretendem Organversagen und chronischer Abstoßung beteiligt (Vella 1997).

1.2.2 Diagnostik einer Abstoßungsreaktion

Es existieren klinische Parameter, die auf eine Abstoßung hinweisen. So können ein Anstieg von Körpertemperatur, Körpergewicht und Serumkreatinin sowie eine verminderte Diurese Anzeichen für eine akute Abstoßung sein (Wollenberg 2000).

Die Farbdoppler-Sonografie eignet sich nur bedingt zur Diagnostik einer akuten Abstoßungsreaktion. Sie kann jedoch ein nützliches Hilfsmittel sein, um die Indikation zur Nierenpunktion definitiv stellen zu können (Salgado 2002). Ein sonografisch feststellbarer intrarenaler Doppler-Parameter, der erhöhte Widerstandsindex (Resistance Index, RI), wird in Verbindung mit einer akuten Abstoßungsreaktion gebracht (Wollenberg 2000). Dupont et al ermittelten für die Erkennung einer Abstoßung bei einem hohen Schwellenwert ($RI > 0,9$) eine Spezifität von 89 %, wobei die Sensitivität nur 6 % betrug (Dupont 2003). Eine Senkung des Schwellenwertes führt hingegen zu einem Anstieg der Sensitivität und einer Erniedrigung der Spezifität. Das gleichzeitige Vorliegen einer akuten tubulären Nekrose besitzt außerdem einen negativen Einfluss auf die Spezifität (Sharma 2004). Ein erhöhter Index kann darüber hinaus Anzeichen für eine Vielzahl von Nierenerkrankungen sein. So sind auch bei extrarenaler Kompression, postrenaler Obstruktion oder Nierenarterienstenosen hohe Werte zu finden (Tiefenthaler 2001).

Die sichere Diagnose einer Abstoßung beruht aber auf der histologischen Befundung durch einen Pathologen. Im Rahmen einer Nierenbiopsie wird dazu ein Stanzzyylinder aus dem transplantierten Organ gewonnen.

Für die histologische Untersuchung des Biopsates steht die sogenannte Banff-Klassifikation zur Verfügung. Diese Einteilung wurde auf einem Kongress in Banff/Kanada im Jahr 1991 beschlossen und seitdem ständig überarbeitet und weiterentwickelt. (Racusen 1999, Solez 2008). Sie erfasst sowohl akute als auch chronische Veränderungen. Im weiteren wird nur auf die akute Abstoßungsreaktion eingegangen. Diesbezüglich sieht die Klassifikation für die zelluläre akute Abstoßung (T-Zell-vermittelt) eine histopathologische Einteilung in drei Grade vor (siehe Tab. 1.1).

Banff-Grad	histopathologischer Befund
I	tubulointerstitielle Abstoßung ohne Arteriitis
IA	moderate Tubulitis
IB	schwere Tubulitis
II	vaskuläre Abstoßung
IIA	moderate intimale Arteriitis
IIB	schwere intimale Arteriitis
III	schwere Abstoßungsreaktion mit transmuraler Arteriitis

Tab. 1.1: Banff-Klassifikation der akuten T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion (Kategorie 4).

Eine Borderline-Abstoßung ist laut Banff-Klassifikation definiert als fokale milde Tubulitis ohne Vorliegen einer intimalen Arteriitis. Es liegt demnach histologisch eine Abstoßung Grad IA vor, gleichzeitig bestehen jedoch keine deutlichen klinischen Anzeichen.

Die Nierenpunktion ist als diagnostisches Hilfsmittel zur Verlaufskontrolle ohne klinischen Hinweis auf eine Abstoßung anerkannt (Protokollbiopsie). Jedoch ist dieses Verfahren nicht frei von Komplikationen. Die häufigsten Komplikationen sind arterio-venöse Fisteln, Hämaturie und perirenale Hämatome (Abb. 1.2). Schwarz et al. fanden bei 1 % der Punktionen eine "major complication", welche beispielsweise das Transfundieren von Blutkonserven oder das Legen eines Blasenkatheters notwendig machte (Schwarz 2005).

	18-gauge needle n = 1222	16-gauge needle n = 448
Gross hematuria	45 (3.7%)	13 (2.9%)
Perirenal hematoma	24 (2%)	17 (3.8%)*
Arterio-venous fistula	102 (8%)	20 (4.5%)
Hospitalization	22 (1.8%)	10 (2.2%)
Urinary catheter	11 (0.9%)	1 (0.2%)
Blood transfusion	3 (0.2%)	2 (0.4%)

Abb. 1.2: Komplikationen bei Nierenbiopsien (Schwarz 2005)

In einer weiteren Studie, bei der etwas größere Punktionsnadeln (14 gauge) verwendet wurden, traten unter 345 transplantierten Patienten 2,7 % "major complications" bei einer gesamten Komplikationsrate von 8,7 % auf. (Preda 2003).

1.2.3 Häufigkeit und Verlauf von Abstoßungsreaktionen

Die Häufigkeit einer akuten Abstoßungsreaktion liegt zum jetzigen Zeitpunkt etwa zwischen 10 und 15 % innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation. Vor allem durch Verbesserung der immunsuppressiven Behandlung konnte die Rate der akuten Abstoßungsreaktionen in den vergangenen Jahrzehnten drastisch gesenkt werden (Segoloni 2006). In Abbildung 1.3 ist diese Beobachtung dargestellt.

Year	Acute rejection rate (%)		References
	Ohio State University (3)	Other authors	
1977-1980		64	(84)
1982-1992	47		
1992-1995	49	48	(13)
1995-1998	22.5	16	(85)
1998-2000	7.5	6.5	(86)

Abb. 1.3: Verbesserung der Abstoßungsrate von 1977-2000 (Segoloni 2006)

Nankivell et al. beobachteten eine Abstoßung vorwiegend in den ersten Monaten nach einer Transplantation (Abb. 1.4). Darüber hinaus zeigte sich, dass eine durchgemachte schwere akute Abstoßung das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Allograft-Nephropathie (CAN) erhöht (Nankivell 2003).

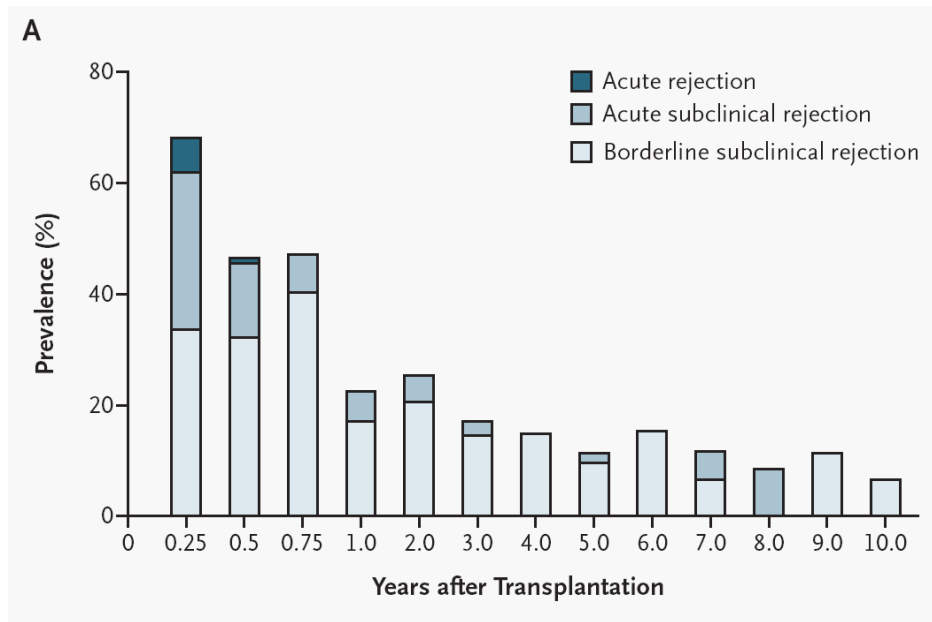


Abb. 1.4: Punktprävalenz der Abstoßung von Transplantatnieren (Nankivell 2003)

Patienten mit stabiler Organfunktion nach Lebendspende wiesen zu 49 % histologisch einen Normalbefund auf, zu 37,8 % eine Borderline-Abstoßung, und zu 13,2 % eine akute Abstoßung (Choi 2005). Dies zeigt, dass auch bei unauffälliger Klinik eine Abstoßung vorliegen kann.

Des weiteren untersuchten Choi et al. das Organüberleben von 304 nierentransplantierten Patienten im Verlauf von bis zu 10 Jahren. Es zeigte sich eine Verringerung der Überlebensrate auf nur 60 % bei einer erfolgten akuten Abstoßung. Bei Patienten mit Normalbefund oder Borderline-Veränderungen ergab sich ein signifikant ($p < 0,05$) besseres Überleben des Organs (siehe Abb. 1.5).

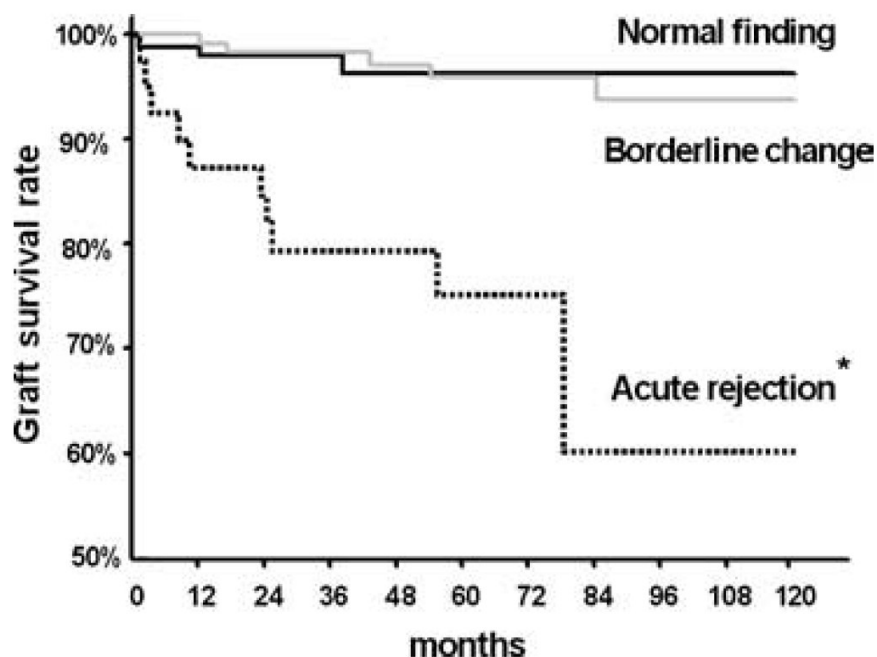


Abb. 1.5: Transplantatüberleben nach akuter Abstoßung (Choi 2005)

1.2.4 Prävention und Therapie einer Abstoßungsreaktion

Die Vermeidung einer Abstoßungsreaktion kann prinzipiell an verschiedenen Punkten ansetzen. Zum einen sollten die MHC-Komplexe von Spender und Empfänger eine große Ähnlichkeit aufweisen. Besonders bei postmortalen Organspenden sollte auf eine gute Übereinstimmung geachtet werden, da größere Unterschiede zwischen den MHC-Komplexen (Mismatch) zum häufigeren Auftreten einer akuten Abstoßungsreaktion führen (Choi 2005).

Auch die Dauer der kalten Ischämiezeit des Organs korreliert positiv mit der Häufigkeit einer akuten Abstoßung, das Risiko steigt pro Stunde Ischämiezeit um 4 % an (Mikhalski 2008). Daher sind ein möglichst schneller Transport des Organs und eine gute Organisation der Transplantation wichtig.

Andererseits ist eine Immunsuppression nötig, um die Abwehrreaktion gegen das fremde Organ zu unterdrücken. Hier werden Steroide, Cyclosporin A, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil eingesetzt (Kälble 2005). Cyclosporin A hemmt die Freisetzung von Interleukinen und somit die Aktivierung von T-Lymphozyten. Tacrolimus besitzt eine ähnliche, allerdings etwas stärkere Wirkung (Nijkamp 2005). Mycophenolatmofetil reduziert unter anderem durch eine Hemmung der Purinsynthese die T-Zell-Proliferation (Allison 2005).

Sollte es zu einer akuten Abstoßung kommen, stehen zur Therapie vor allem Corticosteroide und Antithymozytenglobulin zur Verfügung. Corticosteroide sind in höheren Dosen immunsuppressiv wirksam und werden zur Behandlung von leichteren Abstoßungen als Stoßtherapie eingesetzt. Antithymozytenglobulin richtet sich mit seinen Antikörpern direkt gegen T-Zellen und kann bei einer stärkeren Abstoßung verwendet werden. Bei einer humoralen Abstoßungsreaktion kann eine Plasmapherese helfen, die gegen das Transplantat gebildeten Antikörper zu entfernen (Marks 2006).

1.3 Eicosanoide

1.3.1 Der Arachidonsäurestoffwechsel

Die Arachidonsäure wird im Körper aus der essentiellen omega-6-Fettsäure Linolsäure synthetisiert. Chemisch gesehen ist Arachidonsäure eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit 20 C-Atomen. Sie ist die "Muttersubstanz" der sogenannten Eicosanoide, welche im Organismus verschiedene Aufgaben als Signalstoffe erfüllen. Für die Biosynthese von Eicosanoiden wird Arachidonsäure aus Zellmembran-Phospholipiden durch Phospholipasen abgespalten (Löffler 2007 [2]).

Wie in Abbildung 1.6 beschrieben, werden über Cyclooxygenasen die Prostaganoide (Prostaglandine und Thromboxane) gebildet. Lipxygenasen führen zur Entstehung von Leukotrienen und verschiedenen Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs). Die Bildung von Epoxyeicosatriensäuren erfolgt über die Cytochrom P-450 Epoxygenasen (Smith 1989).

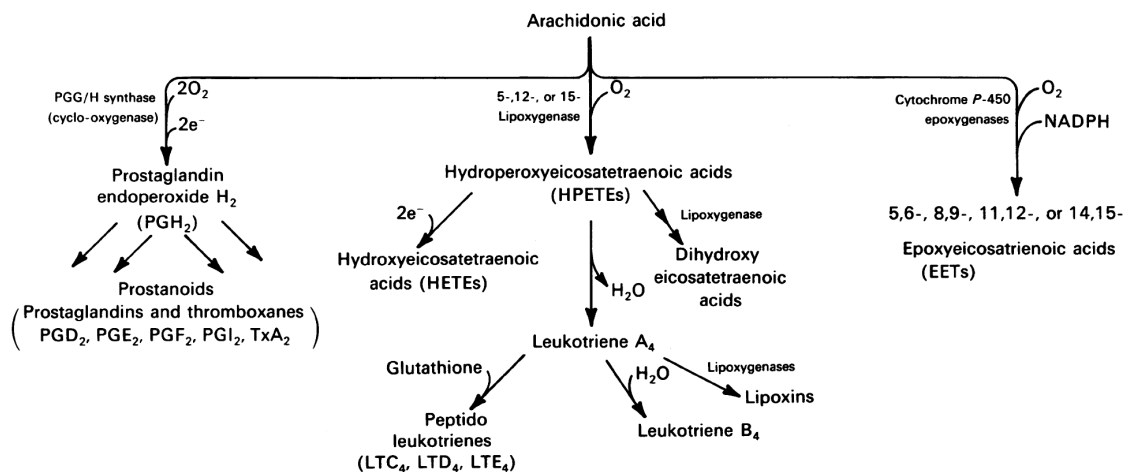


Abb. 1.6: Stoffwechselwege der Arachidonsäure (Smith 1989)

1.3.2 Eicosanoide und Abstoßung von transplantierten Nieren

Es existieren Hinweise auf eine Bedeutung von Eicosanoiden für die Abstoßung von Nierentransplantaten. So konnte im Tierversuch eine erhöhte Produktion von Leukotrien B_4 in abgestoßenen Nieren gezeigt werden (Spurney 1994). Neueren Untersuchungen zufolge führte hingegen das Ausschalten der 5-Lipoxygenase (Bildung von Leukotrien B_4) bei Mäusen - anders als erwartet - zu einer beschleunigten Abstoßungsreaktion (Goulet 2001). Diese kontroversen Beobachtungen verdeutlichen, dass die Bedeutung der 5-Lipoxygenase noch unklar ist. Eine Untersuchung der Ausscheidung von Leukotrien B_4 während einer Abstoßungsreaktion erscheint somit lohnenswert.

Kürzlich konnte die Verteilung bestimmter Lipoxygenasen und Leukotrien-Rezeptoren in der Niere ermittelt werden. Es stellte sich dabei eine besonders starke Expression von Leukotrien B_4 -Rezeptoren und von Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren Typ 1 im Glomerulus heraus. Weiterhin konnte mRNA der 15-Lipoxygenase (15-LOX) vor allem im Sammelrohr gefunden werden (Reinhold 2006). 15-LOX ist für eine Umwandlung der Arachidonsäure zu 15-HETE verantwortlich. Bei Überexpression der 15-Lipoxygenase konnte im Tierversuch ein antiinflammatorischer Effekt festgestellt werden (Serhan 2003). Im Zusammenhang mit einer Abstoßung kann vermutet werden, dass der protektive Effekt der 15-Lipoxygenase fehlt und somit weniger 15-HETE mit dem Urin ausgeschieden wird.

12-Lipoxygenase (12-LOX) führt zur Bildung von 12-HETE und wurde innerhalb der Niere ausschließlich im Glomerulum gefunden (Reinhold 2006). Mangino et al. konnten bereits früher in der Rinde von abgestoßenen Nierentransplantaten bei Hunden eine deutlich

erhöhte Produktion von 12-HETE finden. Die gefundenen Werte korrelierten positiv mit dem Grad der Gewebszerstörung (Mangino 1987). Dies lässt die Hypothese zu, dass bei der Abstoßung humaner Nierentransplantate 12-HETE vermehrt ausgeschieden wird.

Auch für die Expression von Cyclooxygenasen (COX) konnte ein Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen ermittelt werden. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen wurde in den Biopsaten von akut abgestoßenen Nieren eine erhöhte Expression von COX-1 und COX-2 festgestellt (Hoffmann 2006). Somit ist eine erhöhte Ausscheidung von Prostaglandinen bei Abstoßung denkbar.

1.4 Arachidonsäurestoffwechselprodukte als Abstoßungsmarker?

Vor dem Hintergrund der ständig steigenden Zahl dialysepflichtig niereninsuffizienter Patienten auf der Warteliste zur Nierentransplantation ist eine optimale Nachsorge der transplantierten Patienten oberstes Gebot. Die erwähnte Protokollbiopsie kann eine Abstoßungsreaktion erkennen und beweisen. Wie beschrieben ist dieses Verfahren jedoch nicht frei von Risiken. Daher erscheint es sinnvoll, das Augenmerk auf die Entwicklung nicht-invasiver Kontrollmethoden zu richten. Auch wenn solche Methoden eine Biopsie vielleicht nicht in allen Fragestellungen vollständig ersetzen können, so stellen sie möglicherweise eine sinnvolle und vor allem schonende Ergänzung dar.

Neue Möglichkeiten der Diagnostik bei Nierentransplantatierten könnten sich aus der Messung von Stoffwechselprodukten aus dem Urin ergeben. Bei anderen Krankheitsbildern wurden bereits veränderte Ausscheidungen von Arachidonsäurestoffwechselprodukten nachgewiesen. So konnte beispielsweise bei Patienten mit Asthma eine vermehrte Konzentration von Leukotrien E₄ im Urin gemessen werden (Asano 1995). Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten höhere Werte von 12(S)-HETE im Urin (Gonzalez-Nunez 2001). Eine vermehrte Ausscheidung von 12-HETE, 15-HETE sowie von Leukotrien B₄ wurde bei Vorliegen eines Zellweger-Syndroms (Peroxisomen-Defizienz) beobachtet (Mayatepek, Lehmann 1996; Mayatepek, Flock 1999).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Urinausscheidung von Arachidonsäurestoffwechselprodukten und einer akuten Abstoßungsreaktion zu ermitteln.

Bezüglich der Produktion von 12-HETE, 15-HETE und Leukotrien B₄ existieren Hinweise für einen Zusammenhang mit einer Abstoßungsreaktion (siehe Kapitel 1.3). Da außerdem für die Urinausscheidung von HETEs und Leukotrienen bei einer Abstoßungsreaktion keine Daten in der Literatur vorhanden sind, wurde diese Reihe um Leukotrien E₄ ergänzt.

Da die Expression von Cyclooxygenasen ebenfalls eine Rolle bei der Abstoßung zu spielen scheint (siehe Kapitel 1.3), wurden auch die Konzentrationen von Prostaglandin E Metaboliten (erfasst alle Metaboliten von Prostaglandin E₂) sowie 6-keto Prostaglandin F_{1α} (der direkte Metabolit von Prostacyclin = Prostaglandin I₂) bestimmt. Für die Messung der beiden Prostaglandin-Derivate wurde von vorn herein eine orientierende Messung mit etwas kleinerer Zahl festgelegt. Auch das Durchführen einer aufwändigen Aufreinigung limitierte die verwendete Probenzahl.

In dieser Arbeit soll die Urin-Konzentrationen dieser Eicosanoide bei nierentransplantierten Patienten mit histologisch gesicherter Abstoßung ermittelt werden. Es erfolgt ein Vergleich mit Proben vor oder nach erfolgter Abstoßung sowie mit einer Kontrollgruppe ohne Abstoßung.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Es wurden im Zeitraum von Juli 2003 bis Dezember 2006 im Rahmen der ReForM C Studie „Funktionsverlust von Nierentransplantaten: Bedeutung immunologischer und nicht-immunologischer Faktoren“ am Klinikum der Universität Regensburg Urinproben von nierentransplantierten Patienten gesammelt. Sämtliche Proben wurden innerhalb einer Stunde nach Asservierung bei -20°C gefroren. Die Probennahme erfolgte am Tag der Nierenpunktion. Die dabei gewonnenen Biopsate wurden anschließend auf eine mögliche Abstoßungsreaktion untersucht.

Es wurden drei Gruppen von Patienten untersucht. In Gruppe A sind die Proben von 9 Patienten (3 weiblich, 6 männlich) zusammengefasst, welche in der Protokollbiopsie 14 Tage nach Transplantation keine Abstoßung zeigten, bei denen es jedoch im Verlauf der folgenden 3 Monate zu einer Abstoßung kam (A: Abstoßung NEIN-JA). Bei den 8 Patienten der Gruppe B (3 weiblich, 5 männlich) bestand bereits zum Zeitpunkt der ersten Probe eine Abstoßungsreaktion, die zweite Probe repräsentiert hingegen den Zeitpunkt nach Therapie einer histologisch gesicherten Abstoßung (B: Abstoßung JA-NEIN). Demgegenüber stehen in Gruppe C die Urinproben von 17 Patienten (7 weiblich, 10 männlich), die sowohl in der ersten Protokollbiopsie 14 Tage nach Transplantation als auch in der 3-Monats-Protokollbiopsie keinerlei Anzeichen für eine Abstoßungsreaktion zeigten (C: Kontrolle NEIN-NEIN).

Das Alter der untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation betrug im Mittel 47,9 Jahre bei einer Standardabweichung von 13,9. Die immunsuppressive Behandlung der Patienten erfolgte in der Regel mit einer Kombination aus Tacrolimus und Mycophenolatmofetil. 5 Patienten wurden mit Cyclosporin A behandelt.

Nach Ausschluss von fehlerhaften Messungen ergaben sich für die einzelnen Parameter die in Tabelle 2.1 zusammengefassten Probandenzahlen.

	A: Abstoßung NEIN-JA	B: Abstoßung JA-NEIN	C: Kontrolle NEIN-NEIN
12(S)-HETE	7	8	13
15(S)-HETE	9	8	17
Leukotrien B ₄	9	8	17
Leukotrien E ₄	9	8	17
Prostaglandin E Metaboliten	5	5	10
6-keto-Prostaglandin F _{1α}	4	4	7

Tab. 2.1: *Eingesetzte Probanden bei den verschiedenen Messparametern*

Sämtliche Urinproben wurden zum Einfrieren in 10 mL-Urinmonovetten abgefüllt. Um die Messung aller Parameter unter gleichen Bedingungen durchführen zu können, wurden die Proben beim ersten Auftauen auf 1,5-mL-Reagiergefäße aliquotiert und anschließend noch einmal eingefroren.

Außerdem wurde unmittelbar nach dem Auftauen von jeder Probe ein Aliquot in das Labor für klinische Chemie am Universitätsklinikum Regensburg geschickt, um dort mit einer Doppelbestimmung die Konzentration von Kreatinin zu ermitteln.

2.2 Verwendete Enzyme Immunoassay Kits und sonstige Materialien

Die Messungen wurden mit Enzyme Immunoassay Kits (EIA Kits) von Cayman Chemical und Assay Designs durchgeführt. Eine genaue Aufstellung aller verwendeten Materialien und Geräte ist im Anhang 8.1 zusammengefasst.

2.3 Prinzip des Enzyme Immunoassay

Der Enzyme Immunoassay (EIA) ermöglicht die Messung der Konzentration eines bestimmten Stoffes mit Hilfe eines Spektrometers, welches die Intensität von Licht bestimmter Wellenlänge ermitteln kann.

Dazu wird eine Platte mit insgesamt 96 Reagiergefäßen (Wells) verwendet, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Diese IgG-Antikörper wurden aus Mäusen gewonnen und sind gegen Kaninchenserum gerichtet. Dieses Antiserum besitzt wiederum spezielle Antikörper, die sowohl an den zu messenden Stoff als auch an den ebenfalls zugegebenen spezifischen Tracer binden. Dieser Tracer besteht aus dem Stoff selbst, ist

jedoch mit dem Enzym Acetylcholinesterase verbunden. Stoff und Tracer konkurrieren somit um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen des Antiserums. Die auf diese Weise entstehenden Komplexe binden daraufhin an die Antikörperbeschichtung.

Sämtliche ungebundenen Stoffe werden anschließend in einem Waschvorgang entfernt. Im letzten Arbeitsschritt wird ein Entwicklungsreagenz zugegeben. Dieses enthält das entsprechende Substrat für Acetylcholin. Das Produkt der nun folgenden enzymatischen Reaktion ist farbig und absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Mit einem Spektrometer kann die Intensität dieser Farbe bestimmt werden.

Da nur die mit Tracer gebundenen Komplexe farbig reagieren, ist die Intensität um so stärker, je weniger vom gesuchten Stoff vorhanden ist. Liegt umgekehrt eine große Menge des Stoffes vor, fällt die Lichtreaktion entsprechend schwächer aus, da der Tracer kompetitiv von den Antiserum-Bindungsstellen verdrängt wird.

Um die Konzentration des Stoffes berechnen zu können, wird zugleich mit den Proben unter gleichen Bedingungen ein Standard gemessen. Dieser besitzt eine bekannte Konzentration des gewünschten Stoffes und wird in einer Verdünnungsreihe mit absteigender Konzentration angesetzt. Wie bei sämtlichen Messungen wird auch beim Standard jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. So entsteht eine Standardkurve, an Hand derer die Konzentration der Proben mit unbekannter Menge bestimmt werden kann.

Für eine zuverlässige Auswertung der Ergebnisse sowie zum Ausschluss von Fehlern werden außer dem Standard und den Proben noch weitere Wells verwendet. "Blank" (Blk) bleibt leer und wird nur im letzten Schritt mit Entwicklungsreagenz gefüllt. Der gemessene Absorptionswert gilt als Nullwert und wird bei der Auswertung von allen anderen Ergebnissen abgezogen.

"Total Activity" (TA) soll die maximal mögliche Farbreaktion ermitteln und die Funktion des Tracers testen. Diese Wells bleiben ebenfalls leer, ihnen wird zusammen mit dem Entwicklungsreagenz noch Tracer zugegeben, was eine direkte und starke Farbreaktion hervorruft.

Mittels "Non-Specific-Binding" (NSB) kann herausgefunden werden, ob andere Stoffe außer dem Antiserum an die Antikörperbeschichtung binden. Dazu wird die auch zum Verdünnen der Proben verwendete Pufferlösung und der Tracer zugegeben. Da das

Antiserum fehlt, dürfte in diesen Wells keine Farbreaktion zu messen sein. So lässt sich unter anderem feststellen, ob die verwendete Verdünnungslösung sauber ist.

Die "B₀"-Wells werden im Prinzip genauso behandelt wie die anderen Proben und der Standard. Da sich jedoch kein zu messender Stoff darin befindet, muss die Farbreaktion stark ausfallen. Hierbei wird die maximale Farbreaktion des gebundenen Tracers bestimmt (Antoine 1991, Pradelles 1985).

2.4 Testen und Etablieren der Methode

Bevor in größerem Umfang Proben gemessen werden konnten, wurden einige Probemessungen durchgeführt. Sie sollten zum einen mit der Methode vertraut machen und zum anderen helfen, möglichst zuverlässige und genaue Messungen zu ermöglichen.

Während weiter unten die genaue Ausführung der letztlich durchgeführten Messungen beschrieben ist, soll dieser Teil lediglich einige Überlegungen und Vorgehensweisen bei dieser Arbeit verdeutlichen.

Zum Testen der Methode wurden Urinproben sowohl eines nierentransplantierten Patienten (P1) sowie auch von Patienten mit Asthma (P2) und pulmonaler Hypertonie (P3) verwendet. Letztere sollten als Positivkontrolle dienen, da speziell bei Asthma bereits erhöhte Leukotrien E₄-Werte gemessen wurden (siehe 1.4).

Eine Fragestellung war, ob die Proben eines Patienten bei verschiedenen Verdünnungen hochgerechnet ähnliche Werte erbringen bzw. mit welchen Verdünnungen die Konzentrationen überhaupt im Messbereich der Standardkurve liegen. Dabei stellte sich heraus, dass die verwendeten Kits teilweise Messschwankungen produzierten. Durch die Verwendung von UltraPure Water konnten diese Schwankungen reduziert werden. Eine Aufreinigung der Proben brachte nur bei Prostaglandin F_{1α} eine deutliche Besserung der Werte, weshalb bei allen anderen Eicosanoiden darauf verzichtet werden konnte. Im Allgemeinen wurde festgestellt, dass Verdünnungen, die beide im linearen Bereich der Standardkurve liegen, auch vergleichbare Werte erbringen. Dieses Verhalten zeigt Abbildung 2.1 exemplarisch für Leukotrien B₄. Der hier zu erkennende nicht unerhebliche Unterschied zwischen den Verdünnungen von P1 lässt sich dadurch erklären, dass der im Vergleich zu P2 und P3 niedrigere Messwert in der Verdünnung 1:10 bereits den linearen Bereich verlässt.

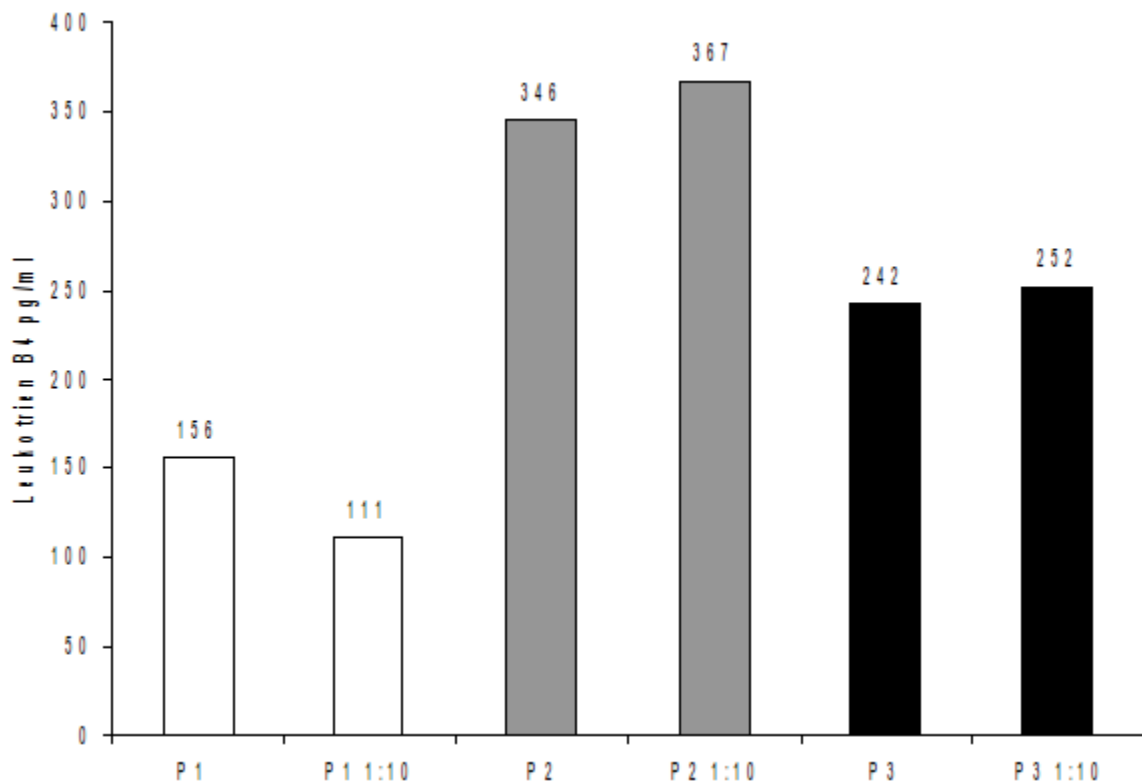


Abb. 2.1: Vergleich von unverdünnten mit 1:10 verdünnten Proben (hochgerechnet, P1-3 = Patient 1-3)

Sobald der lineare Bereich gänzlich verlassen wurde, berechnete die Software z. T. allerdings starke Abweichungen. Durch das Ansetzen von 4 Verdünnungen pro Urinprobe konnte für jedes Eicosanoid der zu erwartende Messbereich ermittelt werden. So konnte sichergestellt werden, dass für jede Probe mindestens eine Verdünnung verlässliche Messwerte im Bereich der Standardkurve erzielte. Besonders bei 12(S)-HETE und 15(S)-HETE zeigte sich hierbei ein besonders enger Messbereich, der trotz einer sorgfältigen Auswahl der eingesetzten Verdünnungen Schwankungen aufwies.

Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob sich das Einfrieren der Proben auf die Messung von Eicosanoiden auswirkt. Daher wurden die ausgewählten Proben direkt nach Asservierung gemessen und anschließend bei -20° C eingefroren.

Nach 14 Tagen wurden die Proben aufgetaut und erneut gemessen. Die Abbildung 2.2 zeigt am Beispiel von Leukotrien E₄, dass hierbei höchstens Änderungen um 30 % auftraten.

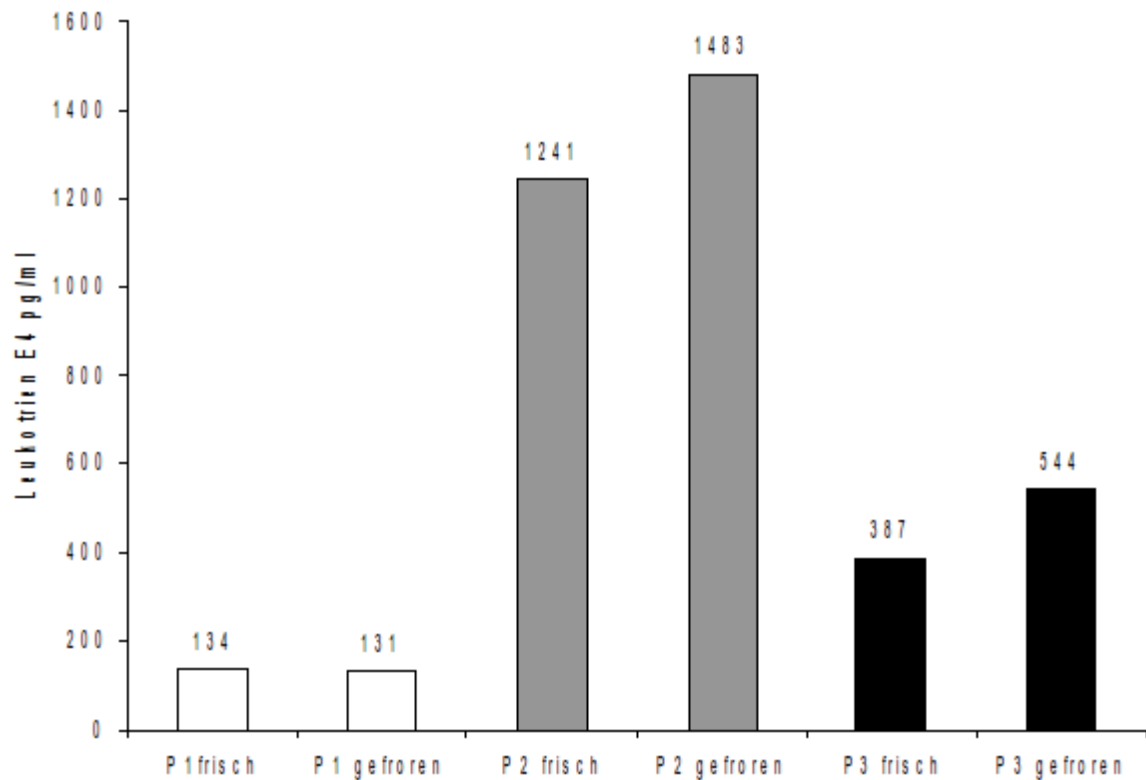


Abb. 2.2: Vergleich von frischen mit gefrorenen Proben (P1-3 = Patient 1-3)

Gerade unter dem Aspekt, dass zwischen Messungen mit verschiedenen EIA Kits geringe Schwankungen auftraten, ist dieses Ergebnis zufriedenstellend. Ebenfalls erwähnenswert ist die ermittelte hohe Leukotrien E₄-Konzentration bei der Urinprobe des Asthmapatienten (P2). So konnte der in der Fachliteratur vorbeschriebene Zusammenhang (siehe 1.4) eindrucksvoll bestätigt werden (Asano 1995).

2.5 Messung ausgewählter Arachidonsäurestoffwechselprodukte

2.5.1 12(S)-HETE

Die Messung von 12(S)-HETE wurde mit dem 12(S)-HETE EIA Kit der Firma Assay Designs (Catalog No. 900-050) durchgeführt. In den Vormessungen hatte sich das Einsetzen von unverdünnten sowie 1:2 verdünnten Proben bewährt. Daher musste als erstes die Verdünnung aller Proben erfolgen. Dazu wurde - in mit Probennummern beschriftete Reagiergefäße (1,5 mL) - jeweils 300 µL des mitgelieferten Assay Buffer vorgelegt. Anschließend wurden die Urinproben für 10 Sekunden gevortext, jeweils 300 µL davon in die vorbereiteten Gefäße gegeben und diese wiederum für 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt.

Die Vorbereitung des Standards erforderte 5 Reagiergefäße (1,5 mL), die mit den Ziffern 1-5 beschriftet wurden. Gefäß 1 wurde mit 1 mL, die Gefäße 2-5 mit jeweils 750 µL Assay Buffer gefüllt. Aus Gefäß 1 wurden jedoch wieder 100 µL entnommen, um anschließend 100 µL des mitgelieferten Standards (500000 pg/mL) einzufüllen. Diese Mischung wurde für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden 250 µL aus Gefäß 1 in Gefäß 2 transferiert und ebenfalls 10 Sekunden gemischt. Diese Prozedur wurde mit den Gefäßen 2 und 3 sowie mit 4 und 5 wiederholt. Besonders wichtig für eine gute Standardkurve war das gründliche Vortexen. Auf diese Weise wurden die Gefäße mit folgenden 12(S)-HETE-Konzentrationen versehen: 1: 50000 pg/mL, 2: 12500 pg/mL, 3: 3125 pg/mL, 4: 781 pg/mL und 5: 195 pg/mL.

Das aufgetaute und auf Zimmertemperatur gewärmte 12(S)-HETE Conjugate wurde nun für die Messung der totalen Aktivität des Tracers (siehe 2.3) 1:10 verdünnt, indem 50 µL davon in einem 1,5-mL-Reagiergefäß mit 450 µL Assay Buffer gemischt und wieder für 10 Sekunden gevortext wurden.

Für die Zubereitung des Waschpuffers wurden mit Hilfe einer serologischen Pipette 5 mL des mitgelieferten Waschpufferkonzentrates in ein geeichtes 100 mL Glasgefäß gegeben und anschließend mit 95 mL Ultra Pure Water der Firma Cayman Chemical (Cat. No. 400000) aufgefüllt.

Nun erfolgte das Befüllen der mitgelieferten 96-Well-Platte. Alle Messungen erfolgten doppelt, je Probe wurden also 2 Wells benötigt. Tabelle 2.2 (s. u.) zeigt exemplarisch

einen Teil der Plattenbelegung. Außerdem wurden sowohl der Standard als auch die Proben kurz vor dem Pipettieren nochmals für 5 Sekunden gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung des Messsubstrates in den Proben zu erzielen. Jeweils 100 µL Assay Buffer wurden in die Wells für NSB (Non-Specific-Binding) und B₀ (maximale Farbreaktion des gebundenen Tracers, siehe 2.3) gegeben, im Beispiel sind dies die Wells E1, F1 (NSB) sowie G1 und H1 (B₀). Aus den Gefäßen 1-5 der zuvor erstellten Standardverdünnungsreihe wurden ebenso jeweils 100 µL in die entsprechenden Wells der Reihen 2 und 3 auf der Platte pipettiert. Die Bezeichnung S1 in der Tabelle entspricht dabei dem Gefäß 1. Anschließend konnten die restlichen Wells mit jeweils 100 µL der Proben befüllt werden. So wurden zum Beispiel jeweils 100 µL der unverdünnten Probe 1 (1:1(1)) in die Wells A4 und A5 pipettiert und die Verdünnung der gleichen Probe in die Wells B4 und B5 gegeben. Analog dazu wurde die gesamte Platte mit weiteren Proben und deren Verdünnungen befüllt. In die NSB-Wells wurden weitere 50 µL Assay Buffer gegeben. Nun wurden jeweils 50 µL des bereits erwähnten 12(S)-HETE Conjugate mit Hilfe einer Wiederholungspipette in alle Wells außer TA (Total Activity) und Blk (Blank) pipettiert. Zum Schluss wurden noch jeweils 50 µL des mitgelieferten 12(S)-HETE-Antikörpers in alle Wells außer Blk, TA und NSB gefüllt.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S5	1:1(1)	1:1(1)	1:1(5)	1:1(5)
B	Blk	S1	S5	1:2(1)	1:2(1)	1:2(5)	1:2(5)
C	TA	S2		1:1(2)	1:1(2)	1:1(6)	1:1(6)
D	TA	S2		1:2(2)	1:2(2)	1:2(6)	1:2(6)
E	NSB	S3		1:1(3)	1:1(3)	1:1(7)	1:1(7)
F	NSB	S3		1:2(3)	1:2(3)	1:2(7)	1:2(7)
G	B ₀	S4		1:1(4)	1:1(4)	1:1(8)	1:1(8)
H	B ₀	S4		1:2(4)	1:2(4)	1:2(8)	1:2(8)

Tab. 2.2: Plattensetup bei 12(S)-HETE (Auszug)

Nach dem Befüllen der Platte wurde diese mit der mitgelieferten Klebefolie abgedeckt und bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang auf einem Plattenmischgerät bei ca. 500 rpm inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells über einem Waschbecken ausgeleert und auf einem Stapel Papierhandtücher vorsichtig ausgeklopft. Nun wurde ein Teil des zubereiteten Waschpuffers in ein passendes Schiffchen gefüllt und mit Hilfe einer 8-Fach-Pipette wurden in jedes Well 400 μL davon gegeben. Danach erfolgte erneut ein Ausklopfen. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach dem dritten und letzten Waschgang mussten die Wells so lange ausgeklopft werden, bis kein Waschpuffer mehr zu sehen war.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 5 μL des verdünnten 12(S)-HETE-Conjugate in die TA-Wells gegeben. Anschließend wurden 200 μL des mitgelieferten para-Nitrophenyl Phosphate Substrate (pNpp Substrate) wieder mit Hilfe der 8-fach-Pipette in jedes Well pipettiert und die Platte mit Klebefolie abgedeckt. Darauf folgte nochmals eine Inkubation der Platte, diesmal allerdings für 3 Stunden bei 37° C ohne Mischgerät.

Während der Inkubationszeit verfärbte sich der Inhalt der Wells je nach 12(S)-HETE-Konzentration mehr oder weniger stark gelb. Nach Ablauf der 3 Stunden musste noch die mitgelieferte Stop Solution zugegeben werden, um die Reaktion zu beenden. Dazu wurden nach Abziehen der Folie in jedes Well noch 50 μL Stop Solution pipettiert.

Unmittelbar danach musste mit einem Plattenlesegerät die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Das Lesegerät wurde über einen PC mit der Software SOFTMAX® von Molecular Devices gesteuert. Dieses Programm erstellt eine Standardkurve und berechnet daraus die Konzentrationen der Proben. Da dieser Vorgang der Auswertung für alle gemessenen Stoffwechselprodukte identisch ist, wird dieser weiter unten ausführlich behandelt (siehe 2.6).

2.5.2 15(S)-HETE

Für die Messung von 15(S)-HETE wurde der 15(S)-HETE Enzyme Immunoassay Kit der Firma Assay Designs (Catalog No. 900-051) verwendet. Bei gleichen Arbeitsschritten wird in der folgenden Beschreibung auf den ähnlich aufgebauten 12(S)-HETE-Kit verwiesen.

In den Vormessungen wurden mit 1:2 sowie 1:5 verdünnten Urinproben die besten Ergebnisse erzielt. Daher mussten auch hier als erstes alle Proben verdünnt werden. Dazu wurde für die 1:2 Verdünnung in mit Probennummern beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße jeweils 300 μL des mitgelieferten Assay Buffer vorgelegt.

Anschließend wurden jeweils 300 μL des zuvor 10 Sekunden gevortexten Urins hinzu gegeben. Nach dem Schließen der Gefäße erfolgte wieder ein 10-sekündiges Mischen mit dem Vortexer. Die 1:5 Verdünnung wurde analog dazu vorgenommen, jedoch mit 400 μL Assay Buffer und 100 μL Urin.

Die Vorbereitung von Waschpuffer und Standard entsprach genau dem Vorgehen bei der Messung von 12(S)-HETE (siehe 2.5.1). Durch den Einsatz des 15(S)-HETE Standard (200000 pg/mL) ergab sich hier allerdings eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen von 15(S)-HETE: 1: 20000 pg/mL, 2: 5000 pg/mL, 3: 1250 pg/mL, 4: 312,5 pg/mL und 5: 78,12 pg/mL.

Die Befüllung der 96-Well-Platte konnte - unter Verwendung von entsprechendem 15(S)-HETE-Antikörper und 15(S)-HETE-Conjugate - ebenfalls analog zu Kapitel 2.5.1 durchgeführt werden (siehe Tab. 2.3).

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S5	1:2(1)	1:2(1)	1:2(5)	1:2(5)
B	Blk	S1	S5	1:5(1)	1:5(1)	1:5(5)	1:5(5)
C	TA	S2		1:2(2)	1:2(2)	1:2(6)	1:2(6)
D	TA	S2		1:5(2)	1:5(2)	1:5(6)	1:5(6)
E	NSB	S3		1:2(3)	1:2(3)	1:2(7)	1:2(7)
F	NSB	S3		1:5(3)	1:5(3)	1:5(7)	1:5(7)
G	B ₀	S4		1:2(4)	1:2(4)	1:2(8)	1:2(8)
H	B ₀	S4		1:5(4)	1:5(4)	1:5(8)	1:5(8)

Tab. 2.3: Plattensetup bei 15(S)-HETE (Auszug)

Nach dem Befüllen der Platte wurde diese mit der mitgelieferten Klebefolie abgedeckt und bei einer Temperatur von 4° C für 18-24 Stunden inkubiert.

Der anschließende Waschvorgang konnte nach Ablauf der längeren Inkubationszeit wiederum genau wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben durchgeführt werden.

Danach wurden jeweils 5 µL 15(S)-HETE-Conjugate unverdünnt in die TA-Wellen gegeben. Mit dem anschließenden Pipettieren von 200 µL des mitgelieferten pNpp Substrats in jedes Well mit der 8-fach-Pipette wurde die Farbreaktion gestartet. Nach Abdecken der Platte mit Klebefolie erfolgte eine weitere Inkubation für 1 Stunde bei einer Temperatur von 37° C.

Nach Ablauf der 60 Minuten und Abziehen der Folie wurde mit dem Zugabe von 50 µL der mitgelieferten Stop Solution die Reaktion beendet.

Unmittelbar danach musste - analog zur Messung von 12(S)-HETE (siehe 2.5.1) - mit einem Plattenlesegerät die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Weitere Einzelheiten zur Messung finden sich in Kapitel 2.6.

2.5.3 Leukotrien B₄

Bei der Ermittlung von Leukotrien B₄ in den Urinproben kam der Leukotriene B₄ EIA Kit der Firma Cayman Chemical (Catalog No. 520111) zum Einsatz. Mit unverdünnten Proben wurden meist gute Ergebnisse erzielt. Um jedoch auch bei höheren Konzentrationen zuverlässige Werte zu messen, wurde zusätzlich eine 1:5 Verdünnung erstellt.

Bevor die Verdünnung hergestellt werden konnte, wurden alle für den Kit benötigten Puffer zubereitet. Zur Herstellung des EIA Buffer wurde der Inhalt des mitgelieferten EIA Buffer Concentrate (10 mL) mit 90 mL UltraPure Water (Cayman Chemical, Catalog No. 400000) mit Hilfe einer serologischen Pipette verdünnt. Um von dem kristallinen Puffer-Konzentrat nichts zu verlieren, wurde das Originalgefäß noch mit dem zur Verdünnung verwendeten Wasser ausgespült.

Zur Waschpuffer-Zubereitung wurde ein geeichtes 500 mL-Glasgefäß benötigt. Mit einer 1000 µL-Pipette wurden 1,25 mL des im Kit enthaltenen Wash Buffer Concentrate in das Glasgefäß gegeben und anschließend mit UltraPure Water bis zur 500 mL-Markierung aufgefüllt. Zuletzt wurden noch 250 µL des mitgelieferten Tween 20 hinzugefügt.

Nun konnte die Verdünnung der Proben erfolgen. Dazu wurden entsprechend beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße mit jeweils 400 µL EIA Buffer befüllt. Nach Zugabe von jeweils 100 µL der zuvor 10 Sekunden gevortexten Proben wurden alle Gefäße geschlossen und nochmals 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt.

Zur Vorbereitung des Standards wurden 8 Reagiergefäße (1,5 mL) mit den Ziffern 1-8 beschriftet und ein weiteres mit dem Buchstaben S markiert. Vor dem Start der Verdünnungsreihe wurde ein sogenannter Bulk Standard erstellt. Dafür wurde eine 200- μ L-Pipettenspitze in 100% Ethanol equilibriert, indem 3 mal 100 μ L Ethanol aufgezogen und wieder abgelassen wurden. Anschließend konnten mit der leeren Spitze 100 μ L des mitgelieferten LTB₄ Standard (50 ng/mL) in das Gefäß S transferiert werden. Dieses Gefäß wurde danach mit 900 μ L UltraPure Water aufgefüllt. Auf diese Weise wurde eine Konzentration von 5 ng/mL erreicht. Nun wurden die Gefäße 1-8 mit EIA Buffer befüllt: 900 μ L in das Gefäß 1 und 500 μ L in die Gefäße 2-8. Jetzt wurden 100 μ L aus Gefäß „S“ in Gefäß 1 gegeben und für 10 Sekunden gevortext. Um die Verdünnungsreihe zu erstellen, wurden 500 μ L aus Gefäß 1 genommen und in Gefäß 2 gefüllt und anschließend für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden 500 μ L von Gefäß 2 nach Gefäß 3 transferiert und ebenfalls 10 Sekunden gevortext. Dieses Vorgehen wurde für die Gefäße 4-8 wiederholt. So ergab sich folgende Verdünnungsreihe: 1: 500 pg/mL, 2: 250 pg/mL, 3: 125 pg/mL, 4: 62,5 pg/mL, 5: 31,3 pg/mL, 6: 15,6 pg/mL, 7: 7,8 pg/mL, 8: 3,9 pg/mL.

Bevor Standard und Proben auf die Platte pipettiert werden konnten, mussten noch Tracer und Antiserum zubereitet werden. Mit Hilfe einer 10 mL fassenden serologischen Pipette wurden 6 mL EIA Buffer in das kleine Glasgefäß des mitgelieferten 100 dtn LTB₄ Tracer gefüllt. Um diesem farblosen Gemisch eine Farbe als Pipettierhilfe zu verleihen, wurden noch 60 μ L des ebenfalls mitgelieferten Tracer Dye hinzugefügt. Analog dazu wurde das 100 dtn LTB₄ Antiserum mit 6 mL EIA Buffer aufgefüllt und anschließend mit 60 μ L Antiserum Dye versehen. So entstanden ein rot gefärbter Tracer und ein blau gefärbtes Antiserum.

Die nachfolgende Belegung der Platte erfolgte nach dem unten stehenden Schema (Tab. 2.4). Auf Grund der niedrigen Menge (50 μ L) wurde bei jeder neuen Probe vor dem eigentlichen Pipettieren zwei mal die Pipettiermenge aufgezogen und wieder abgelassen, um bei den Doppelbestimmungen möglichst genau gleiche Mengen zu pipettieren. Außerdem wurden alle Reagiergefäße kurz vor dem Pipettieren nochmals für 5 Sekunden gevortext. Zuerst wurden jeweils 100 μ L EIA Buffer in die NSB-Wells und 50 μ L EIA Buffer in die B₀-Wells gegeben. Beim nachfolgenden Pipettieren des Standards wurde für alle Verdünnungen die gleiche Pipettenspitze verwendet. Beginnend mit der niedrigsten LTB₄-Konzentration (Gefäß 8) und jeweils mit der nächsthöheren Konzentration

fortfahrend, wurden hierbei 50 μL in jedes Well gefüllt und so die Plätze S1-S8 belegt. Beim anschließenden Einfüllen der unverdünnten und 1:5 verdünnten Proben wurde ebenso die Menge von 50 μL je Well pipettiert und somit die entsprechend gekennzeichneten Wells (z. B. 1:1(1) = Probe 1 unverdünnt) gefüllt. Danach wurden mit Hilfe einer Wiederholungspipette jeweils 50 μL des zuvor bereiteten Tracers in alle Wells außer Blk und TA gegeben. Zuletzt kamen weitere 50 μL des blauen Antiserums hinzu, welches in sämtliche Wells mit Ausnahme von Blk, TA und NSB pipettiert wurde.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S1	1:1(1)	1:1(1)	1:1(5)	1:1(5)
B	Blk	S2	S2	1:5(1)	1:5(1)	1:5(5)	1:5(5)
C	NSB	S3	S3	1:1(2)	1:1(2)	1:1(6)	1:1(6)
D	NSB	S4	S4	1:5(2)	1:5(2)	1:5(6)	1:5(6)
E	B ₀	S5	S5	1:1(3)	1:1(3)	1:1(7)	1:1(7)
F	B ₀	S6	S6	1:5(3)	1:5(3)	1:5(7)	1:5(7)
G	TA	S7	S7	1:1(4)	1:1(4)	1:1(8)	1:1(8)
H	TA	S8	S8	1:5(4)	1:5(4)	1:5(8)	1:5(8)

Tab. 2.4: Plattensetup bei Leukotrien B₄ (Auszug)

Nach diesem Vorgang wurde die Platte mit der enthaltenen Klebefolie abgedeckt und für 18 Stunden bei einer Temperatur von 4° C inkubiert. Für den anschließenden Waschvorgang wurde nach Ablauf der Inkubationszeit ein Teil des vorbereiteten Waschpuffers in ein passendes Schiffchen gefüllt. Nach dem Ausleeren des Platteninhaltes wurden zum Auswaschen mit Hilfe einer 8-fach-Pipette jeweils 400 μL Waschpuffer in jedes Well gefüllt. Danach erfolgte ein erneutes Ausleeren und danach ein vorsichtiges Ausklopfen der Platte auf einem Stapel Papierhandtücher. Dieser Waschvorgang wurde 4 weitere Male wiederholt. Nach dem letzten Waschen musste die Platte gründlich ausgeklopft werden, um den Waschpuffer komplett aus den Wells zu entfernen.

Für den letzten Schritt der Entwicklung musste das so genannte Ellman's Reagent zubereitet werden. Dazu musste der Inhalt des mitgelieferten 100 dtn Gefäß mit Ellman's Reagent in 20 mL UltraPure Water aufgelöst werden. Mit einer 10 mL fassenden

serologischen Pipette wurden ca. 5 mL des Wassers in dieses Gefäß gegeben und nach kurzem Schütteln in ein 50-mL-Reagiergefäß gegeben. Um sicher zu gehen, dass sich der gesamte Inhalt auflöst, wurde dieser Vorgang insgesamt dreimal wiederholt und das noch fehlende Wasser in das Reagiergefäß gegeben. Nach dem Umfüllen in ein Schiffchen konnten mit der 8-fach-Pipette alle Wells mit jeweils 200 µL davon befüllt werden. Außerdem wurden zusätzlich jeweils 5 µL des Tracers in die beiden TA-Wells gegeben. Anschließend wurde die Platte wieder mit Klebefolie bedeckt und lichtdicht in Aluminiumfolie eingepackt. Jetzt folgte eine weitere Inkubation für 90 Minuten, wobei die Platte auf einem Mischgerät bei 500 rpm installiert war.

Nach Ablauf von 90 Minuten wurde nach Abziehen der Klebefolie der Plattenboden mit einem Papiertuch von evtl. entstandenen Fingerabdrücken gereinigt und mit einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen. Sofern der B_0 -Wert (mit bereits abgezogenem Blank-Wert) für die optische Dichte bei unter 0,3 lag, wurde die Platte für weitere 15 Minuten lichtdicht verpackt auf das Mischgerät gestellt und später erneut ausgelesen. Der Vorgang der Messung ist im Kapitel 2.6 ausführlich beschrieben.

2.5.4 Leukotrien E_4

Für die Ermittlung von Leukotrien E_4 in den Urinproben wurde der Leukotriene E_4 EIA Kit der Firma Cayman Chemical (Catalog No. 520411) verwendet. Da 1:2 und 1:5 verdünnte Proben bei den Testmessungen die zuverlässigsten Ergebnisse erzielten, wurden diese beiden Verdünnungen hergestellt. Da viele Arbeitsschritte identisch mit der Messung von Leukotrien B_4 waren, wird auf das entsprechende Kapitel verwiesen.

Die zu Beginn erfolgte Herstellung des EIA Buffer und des Waschpuffers entsprach genau dem Vorgehen bei der Messung von Leukotrien B_4 (siehe 2.5.3).

Für die 1:2 Verdünnung wurden entsprechend beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße mit jeweils 300 µL EIA Buffer befüllt. Nach Zugabe von jeweils 300 µL der bereits zuvor 10 Sekunden gevortexten Proben wurden alle Gefäße geschlossen und nochmals 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Die 1:5 Verdünnung entstand analog dazu mit 400 µL EIA Buffer und 100 µL Urin.

Auch die Vorbereitung von Standard, Tracer und Antiserum erfolgte analog zur Messung von Leukotrien B_4 (siehe 2.5.3). Hierfür wurde der mitgelieferte LTE_4 Standard (100 ng/mL)

verwendet, woraus sich bei ansonsten identischem Vorgehen folgende Verdünnungsreihe ergab: 1: 1000 pg/mL, 2: 500 pg/mL, 3: 250 pg/mL, 4: 125 pg/mL, 5: 62,5 pg/mL, 6: 31,3 pg/mL, 7: 15,6 pg/mL, 8: 7,8 pg/mL. Entsprechend wurde für die anderen Reagenzien LTE₄ Tracer und LTE₄ Antiserum eingesetzt.

Bis auf das Einsetzen anderer Verdünnungen (1:2 und 1:5) erfolgte auch die Belegung der Platte auf die gleiche Art und Weise wie in Kapitel 2.5.3 bereits beschrieben. So ergibt sich die in Tabelle 2.5 dargestellte Einteilung.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S1	1:2(1)	1:2(1)	1:2(5)	1:2(5)
B	Blk	S2	S2	1:5(1)	1:5(1)	1:5(5)	1:5(5)
C	NSB	S3	S3	1:2(2)	1:2(2)	1:2(6)	1:2(6)
D	NSB	S4	S4	1:5(2)	1:5(2)	1:5(6)	1:5(6)
E	B ₀	S5	S5	1:2(3)	1:2(3)	1:2(7)	1:2(7)
F	B ₀	S6	S6	1:5(3)	1:5(3)	1:5(7)	1:5(7)
G	TA	S7	S7	1:2(4)	1:2(4)	1:2(8)	1:2(8)
H	TA	S8	S8	1:5(4)	1:5(4)	1:5(8)	1:5(8)

Tab. 2.5: Plattensetup bei Leukotrien E₄ (Auszug)

Die folgende Schritte (Inkubation, Auswaschen der Platte, Zubereitung und Einsatz von Ellman's Reagent sowie die Messung) waren im Wesentlichen ebenfalls mit dem Vorgehen bei Leukotrien B₄ identisch (siehe 2.5.3). Es bestanden nur folgende Unterschiede: Die erste Inkubation erfolgte 18 Stunden bei Raumtemperatur, außerdem wurde nach Anwendung von Ellman's Reagent nur für weitere 60 Minuten inkubiert.

2.5.5 Prostaglandin E Metaboliten

Die Messung von Prostaglandin E₂ erforderte den entsprechenden Prostaglandin E Metabolite EIA Kit der Firma Cayman Chemical (Catalog No. 514531). Die Verwendung von unverdünnten sowie 1:10 verdünnten Proben hatte sich im Vorfeld als sinnvoll erwiesen. Auf Grund der chemischen Instabilität der Endmetaboliten von Prostaglandin E₂

mussten diese vor der Messung in ein stabiles Produkt überführt werden. Dazu wurde eine Derivatisierung durchgeführt.

Zuvor wurden jedoch alle für den Kit benötigten Puffer zubereitet. Zur Herstellung des EIA Buffer wurde der Inhalt des mitgelieferten EIA Buffer Concentrate (10 mL) mit 90 mL UltraPure Water (Cayman Chemical, Catalog No. 400000) verdünnt (siehe auch 2.5.3).

Auf die gleiche Art und Weise wurde auch der benötigte 1 M Phosphate Buffer hergestellt. Dafür wurde der Inhalt des mitgelieferten 100 dtn Phosphate Buffer in 30 mL UltraPure Water in einem weiteren Glasgefäß aufgelöst. So entstand schließlich auch noch der 1 M Carbonate Buffer, hierfür wurden die 100 dtn Carbonate Buffer in 25 mL UltraPure Water aufgelöst. Die Glasgefäße wurden nun geschlossen und so lange geschwenkt, bis die Kristalle vollständig aufgelöst waren.

Aus den bisher zubereiteten Puffern wurden nun 20 mL des sogenannten PGEM Assay Buffer hergestellt. Hierzu wurden mit jeweils frischen serologischen Pipetten 13 mL EIA Buffer, 3 mL Carbonate Buffer und 4 mL Phosphate Buffer in einem Glasgefäß zusammengeführt.

Die außerdem nötige Zubereitung eines Waschpuffers wurde bereits im Kapitel 2.5.3 beschrieben.

Nun konnte die Derivatisierung von Standard und Proben erfolgen. Nach dem Equilibrieren einer 200 µL Pipettenspitze in 100% Ethanol (3x aufziehen und wieder ablassen) wurden mit dieser Spitze 100 µL des im Kit enthaltenen PGEM Standard in ein 1,5-mL-Reagiergefäß übertragen. Anschließend wurden 900 µL UltraPure Water hinzugefügt. Von diesem so entstandenen Bulk Standard mit der Konzentration von 40 ng/mL wurden 50 µL in ein mit dem Buchstaben S beschriftetes 2-mL-Reagiergefäß übertragen. In dieses Gefäß "S" wurden nun noch 950 µL EIA Buffer sowie 300 µL Carbonate Buffer pipettiert. Diese Standard-Lösung musste nun für 18 Stunden bei einer Temperatur von 37° C inkubiert werden. Nach Ablauf dieser Zeit kamen noch 400 µL Phosphate Buffer und 300 µL EIA Buffer hinzu, wodurch im Gefäß S eine Konzentration von 1000 pg/mL entstand.

Zur Derivatisierung der Proben mussten jeweils 500 µL Urin in entsprechend beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße gefüllt werden. Dazu wurden noch jeweils 150 µL Carbonate Buffer

pipettiert, anschließend musste dieses Gemisch ebenfalls für 18 Stunden bei 37° C inkubiert werden. Es war darauf zu achten, dass Standard und Proben für die gleiche Zeitdauer inkubiert wurden. Nach Ablauf der 18 Stunden wurden noch jeweils 200 µL Phosphate Buffer und 150 µL EIA Buffer hinzugefügt. Jetzt konnte auch die 1:10 Verdünnung der nun derivatisierten Proben erfolgen. Dazu wurden jeweils 450 µL des PGEM Assay Buffer in beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße gefüllt. Anschließend wurden jeweils 50 µL des derivatisierten Urins hinzugefügt und diese Mischung für 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt.

Für die Herstellung der Standardverdünnungsreihe wurden 8 Reagiergefäße (1,5 mL) mit den Ziffern 1-8 beschriftet. Diese Gefäße wurden wie folgt mit PGEM Assay Buffer befüllt: 950 µL in das Gefäß 1 und 500 µL in die Gefäße 2-8. Jetzt wurden 50 µL aus dem derivatisierten Gefäß "S" in Gefäß 1 gegeben und für 10 Sekunden gevortext. Um die Verdünnungsreihe zu erstellen, wurden nun 500 µL aus Gefäß 1 genommen und in Gefäß 2 gefüllt und anschließend für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden 500 µL von Gefäß 2 nach Gefäß 3 transferiert und ebenfalls 10 Sekunden gevortext. Dieses Vorgehen wurde für die Gefäße 4-8 wiederholt. So entstand folgende Verdünnungsreihe: 1: 50 pg/mL, 2: 25 pg/mL, 3: 12,5 pg/mL, 4: 6,25 pg/mL, 5: 3,1,3 pg/mL, 6: 1,56 pg/mL, 7: 0,78 pg/mL, 8: 0,39 pg/mL.

Die Zubereitung von PGEM Tracer und Antiserum erfolgte analog zum Vorgehen bei der Messung von Leukotrien B₄ (siehe 2.5.3).

Die nachfolgende Belegung der Platte erfolgte nach dem unten stehenden Schema (Tab. 2.6). Auf Grund der niedrigen Menge (50 µL) wurde bei jeder neuen Probe vor dem eigentlichen Pipettieren 2 mal die Pipettiermenge aufgezogen und wieder abgelassen, um bei den Doppelbestimmungen möglichst genau gleiche Mengen zu pipettieren. Außerdem wurden alle Reagiergefäße kurz vor dem Pipettieren nochmals für 5 Sekunden gevortext. Zuerst wurden jeweils 50 µL EIA Buffer und 50 µL PGEM Assay Buffer in die NSB-Wells sowie 50 µL PGEM Assay Buffer in die B₀-Wells gegeben. Beim nachfolgenden Pipettieren des Standards wurde für alle Verdünnungen die gleiche Pipettenspitze verwendet. Beginnend mit der niedrigsten PGEM-Konzentration (Gefäß 8) und jeweils mit der nächsthöheren Konzentration fortfahrend, wurden hierbei 50 µL in jedes Well gefüllt und so die Plätze S1-S8 belegt. Beim anschließenden Einfüllen der unverdünnten und 1:10 verdünnten Proben wurde ebenso die Menge von 50 µL je Well pipettiert und somit die entsprechend gekennzeichneten Wells (z. B. 1:1(1) = Probe 1 unverdünnt) gefüllt. Danach

wurden mit Hilfe einer Wiederholungspipette jeweils 50 µL des zuvor bereiteten Tracers in alle Wells außer Blk und TA gegeben. Zuletzt kamen weitere 50 µL des blauen Antiserums hinzu, dieses wurde in sämtliche Wells mit Ausnahme von Blk, TA und NSB pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S1	1:1(1)	1:1(1)	1:1(5)	1:1(5)
B	Blk	S2	S2	1:10(1)	1:10(1)	1:10(5)	1:10(5)
C	NSB	S3	S3	1:1(2)	1:1(2)	1:1(6)	1:1(6)
D	NSB	S4	S4	1:10(2)	1:10(2)	1:10(6)	1:10(6)
E	B ₀	S5	S5	1:1(3)	1:1(3)	1:1(7)	1:1(7)
F	B ₀	S6	S6	1:10(3)	1:10(3)	1:10(7)	1:10(7)
G	TA	S7	S7	1:1(4)	1:1(4)	1:1(8)	1:1(8)
H	TA	S8	S8	1:10(4)	1:10(4)	1:10(8)	1:10(8)

Tab. 2.6: Plattensetup bei Prostaglandin E Metaboliten (Auszug)

Nach diesem Vorgang wurde die Platte mit der enthaltenen Klebefolie abgedeckt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Der anschließende Waschvorgang sowie Zubereitung und Anwendung von Ellman's Reagent wurden genau wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben durchgeführt.

Nach dem Pipettieren von Ellman's Reagent und PGEM-Tracer (Total Activity) wurde die Platte wieder mit Klebefolie bedeckt und lichtdicht in Aluminiumfolie eingepackt. Es folgte eine weitere Inkubation für 60 Minuten auf einem Mischgerät bei 500 rpm.

Nach Ablauf von 60 Minuten erfolgte die Messung wie in 2.5.3 und 2.6 beschrieben.

2.5.6 6-keto Prostaglandin F_{1α}

2.5.6.1 Aufreinigung

Die Messung von 6-keto Prostaglandin F_{1α} erfolgte mit dem 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA Kit (Cayman Chemical, Catalog Nr. 515211). In den Probemessungen zeigte sich, dass zuvor aufgereinigte Proben geringere Abweichungen zwischen verschiedenen Verdünnungen aufwiesen. Aus diesem Grund wurde das von Cayman Chemical vorgeschlagene Aufreinigungsprotokoll für alle Proben durchgeführt. Zur Messung der resuspendierten Proben erbrachten Verdünnungen von 1:10 und 1:50 die besten Ergebnisse.

Die Zubereitung von EIA Buffer und Waschpuffer erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

Vor Beginn der Aufreinigung wurde von jeder Urinprobe ein 1,5-mL-Reagiergefäß mit jeweils 250 µL Inhalt erstellt. Da nur eine Vergleichsmessung durchgeführt wurde, war die Mitführung eines so genannten Spike (Standard + Probe) zur Ermittlung des Substratverlustes bei Aufreinigung nicht nötig. Für die spätere Verwendung wurden noch 500 mL gesättigte Kochsalzlösung (ca. 28 %) sowie ein Gemisch aus 500 mL Ethylacetat und 167 mL Aceton (75:25) hergestellt.

Im ersten Schritt wurden zu den 250 µL der Probe 1 mL Aceton gegeben, das Gefäß verschlossen und zwei Mal für jeweils 10 Sekunden gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 4° C für 5 Minuten. Danach wurde die Probe bei 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um ausgefällte Proteine zu entfernen. Der Überstand konnte nun in ein 1,5-mL-Reagiergefäß umgefüllt werden. Danach wurde dieses Gefäß in eine Vakuumzentrifuge gestellt um das Aceton abzusaugen. Dieser Vorgang konnte beendet werden, sobald das Gefäß ausgetrocknet war (ca. 2,5 Stunden). Jetzt wurde die Probe in 1 mL gesättigter NaCl-Lösung (ca. 28 %) resuspendiert und für 10 Sekunden gevortext. Für die weiteren Schritte musste diese Lösung noch in ein 15-mL-Reagiergefäß umgefüllt werden.

Um ein Verbleiben von Probenmaterial im 1,5-mL-Reagiergefäß zu vermeiden, wurde dieses mit 1 mL von einem Gemisch aus Ethylacetat und Aceton (75:25) gespült, und diese Menge ebenfalls in das größere Gefäß umgefüllt. Als nächstes wurden weitere

4 mL Ethylacetat/Aceton mit Hilfe einer serologischen Pipette in das 15-mL-Reagiergefäß gegeben. Nach dem Verschließen des Gefäßes erfolgte ein Vortexen für 10 Sekunden. Von den nun sichtbaren zwei Phasen konnte die obere Phase mit einer serologischen Pipette vorsichtig abgezogen und in ein weiteres 15-mL-Reagiergefäß übertragen werden. Anschließend wurden nochmals 5 mL Ethylacetat/Aceton in das erste 15-mL-Reagiergefäß gefüllt und nach 10 Sekunden vortexen die obere Phase erneut in das zweite Gefäß überführt. Nach diesem Schritt konnten die Proben für bis zu 4 Wochen bei -20° C aufbewahrt werden, um direkt vor der Messung das Ethylacetat/Aceton unter dem Abzug vollständig verdampfen zu lassen. Im Anschluss an diesen Prozess wurde die Probe in 500 µL EIA Buffer resuspendiert und für 10 Sekunden gevortext.

Für die 1:10 Verdünnung wurden entsprechend beschriftete 1,5-mL-Reagiergefäße mit jeweils 900 µL EIA Buffer befüllt. Nach Zugabe von jeweils 100 µL der resuspendierten Proben wurden alle Gefäße geschlossen und 10 Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Die 1:50 Verdünnung entstand durch eine Weiterverdünnung. Wiederum wurden 1,5-mL-Reagiergefäße beschriftet und mit 400 µL EIA Buffer befüllt. Nun erfolgte durch Zugabe von 100 µL der 1:10 Verdünnung die Herstellung einer 1:50 Lösung.

2.5.6.2 Messung

Die Vorbereitung des Standards konnte analog zur Messung von Leukotrien B_4 durchgeführt werden (siehe 2.5.3). Mit dem Einsatz des mitgelieferten 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ Standard (50 ng/mL) ergaben sich folgende Konzentrationen: 1: 500 pg/mL, 2: 250 pg/mL, 3: 125 pg/mL, 4: 62,5 pg/mL, 5: 31,3 pg/mL, 6: 15,6 pg/mL, 7: 7,8 pg/mL, 8: 3,9 pg/mL.

Auch die Zubereitung von Tracer und Antiserum sowie das Befüllen der Platte (siehe Tab. 2.7) erfolgte wie in Kapitel 2.5.3 beschreiben. Es wurden lediglich 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ Tracer und Antiserum sowie die entsprechenden Verdünnungen der zu messenden Proben eingesetzt.

	1	2	3	4	5	6	7
A	Blk	S1	S1	1:10(1)	1:10(1)	1:10(5)	1:10(5)
B	Blk	S2	S2	1:50(1)	1:50(1)	1:50(5)	1:50(5)
C	NSB	S3	S3	1:10(2)	1:10(2)	1:10(6)	1:10(6)
D	NSB	S4	S4	1:50(2)	1:50(2)	1:50(6)	1:50(6)
E	B ₀	S5	S5	1:10(3)	1:10(3)	1:10(7)	1:10(7)
F	B ₀	S6	S6	1:50(3)	1:50(3)	1:50(7)	1:50(7)
G	TA	S7	S7	1:10(4)	1:10(4)	1:10(8)	1:10(8)
H	TA	S8	S8	1:50(4)	1:50(4)	1:50(8)	1:50(8)

Tab. 2.7: Plattensetup bei 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ (Auszug)

Die darauf folgende Inkubation (18 Stunden bei 4° C), das Auswaschen der Platte, die Zubereitung und Anwendung von Ellman's Reagent sowie die Messung nach weiteren 90 Minuten Inkubationszeit wurden genau wie in Kapitel 2.5.3 bereits beschrieben durchgeführt.

2.6 Messung der optischen Dichte

Alle fertigen Platten wurden mit dem Plattenlesegerät "E max precision microplate reader" (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen. Für jedes Well wurde dabei die optische Dichte (OD) ermittelt. Das Lesegerät war an einen PC angeschlossen. Über die dort installierte Software SOFTMAX® (Version 2.34, Molecular Devices) konnte der Auslesevorgang gesteuert werden. In der Setup-Einstellung "Instrument" wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Mode Endpoint L1; Wavelength L1 405; Automix Off; Auto Calibrate On. Mit der Einstellung "Template" wurde das Fenster mit der Plattenbelegung aufgerufen. Hier wurde analog zu oben stehenden Tabellen die Belegung eingetragen. Für die Werte "Blank" und "Standard" waren vom Programm entsprechende Einträge vorgesehen. Hier konnte über den Schaltknopf "Series" die Standardverdünnungsreihe eingetragen werden. Das Programm benötigte lediglich die Startkonzentration und den Multiplikationsfaktor. Alle anderen Wells wurden mit "Unknown" bezeichnet, allerdings wurde jedem Well der entsprechende Name bzw. die Probennummer sowie die Verdünnung eindeutig zugeordnet. Auf diese Weise erhielt die Software die nötigen Informationen für eine Berechnung der Probenkonzentrationen. Nun

konnte die von Fingerabdrücken gereinigte Platte den Markierungen entsprechend in das Gerät eingesetzt werden. Mit dem Befehl "Read Plate" im Menü "Control" wurde der Auslesevorgang gestartet. Im Menüpunkt "Display" konnten danach sowohl die Rohdaten der Messung als auch berechnete Daten angezeigt werden. Ausdrücke wurden von folgenden Daten erstellt: Raw Data Plate (Rohdaten der OD-Werte für jedes einzelne Well), Analyzed Curve (graphische Darstellung der Standardkurve, Curve Fit: 4-Parameter) und Analyzed Report (Ausgabe der errechneten Konzentrationen der jeweiligen Proben).

2.7 Datenverarbeitung

Die auf diese Weise gewonnenen Messwerte wurden anschließend auf ihre Zuverlässigkeit überprüft, indem eine Zuordnung zum linearen Bereich der Standardkurve erfolgte. Unzuverlässig einzustufende Werte wurden ggf. aus der Wertung genommen. Von den verlässlichen Werten wurde nun für jede Probe der Mittelwert errechnet und in eine Excel-Tabelle übertragen, die eine Zuordnung zum jeweiligen Patienten ermöglichte. Um die Messergebnisse untereinander vergleichbar zu machen, mussten diese noch auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen werden. Dafür wurde der erhaltene Messwert durch den zuvor ermittelten Kreatininwert dividiert. Um anschauliche Zahlen zu bekommen, wurde das Ergebnis bei Leukotrien B₄ und Leukotrien E₄ noch mit dem Faktor 100 multipliziert und die Einheit entsprechend verändert. Für die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurden anschließend die Programme Excel® und SPSS® verwendet. Auf diese Weise konnten Tabellen und Diagramme erstellt sowie Signifikanzen und Korrelationen berechnet werden.

Für die Darstellung der Ergebnisse werden unter anderem Boxplot-Grafiken verwendet. Der Median ist der Messwert, der in der Mitte von allen gemessenen Werten liegt, wenn die Ergebnisse der Größe nach sortiert werden. In der "Box" befinden sich 50% aller nächstgelegenen Messwerte, die um den Median (Quartil Q2) nach oben und nach unten abweichen. Die Grenzen der Box werden demnach als oberes (Quartil Q1) und unteres (Quartil Q3) Quartil bezeichnet. Die Linien außerhalb der "Box" stehen für die übrigen stärker abweichenden Werte. Ausreißer, die um mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes vom Median abweichen, werden als Einzelwerte dargestellt und sind den Probennummern entsprechend bezeichnet.

Auf Grund der relativ kleinen Fallzahlen beim Vergleich der Gruppen wurden bei der Signifikanztestung nicht-parametrische Tests verwendet. Beim direkten Vergleich von Verlaufswerten kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz. Für den Vergleich verschiedener Gruppen wurde hingegen der U-Test nach Mann-Whitney herangezogen.

Bei der Berechnung der Korrelationen mit klinischen Parametern wurden alle gemessenen Proben verwendet. Da zugleich von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen wurde, erschien die Verwendung der Korrelation nach Pearson sinnvoll (Zöfel 2003). Als Signifikanzniveau (zweiseitig) für alle Tests wurde $p < 0,05$ festgelegt. Ab einer Korrelation $> 0,2$ kann ein Zusammenhang vermutet werden.

2.8 Erhebung der klinischen Daten

Um die gemessenen Werte auf klinische Parameter beziehen zu können, wurden aus den Krankenakten der Patienten gezielt Daten ausgewählt. Diese Suche erfolgte im Archiv des Universitätsklinikums Regensburg. Hierzu wurden zum Zeitpunkt der jeweiligen Urinprobe folgende Daten ebenfalls erhoben: Körpertemperatur, systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck, Gewicht, Einfuhr/Ausfuhr, Cytomegalievirus(CMV)-Status, Decoyzellen im Urin, Resistance-Indices bei Sonographie, Immunsuppressiva sowie die Art der Therapie bei einer Abstoßungsreaktion.

Folgende Labordaten wurden freundlicherweise vom Institut für klinische Chemie am Universitätsklinikum Regensburg übermittelt: Serumkonzentrationen von Kreatinin, C-reaktivem Protein (CRP), Leukozytenzahl, Immunsuppressivaspiegel sowie der Urinstatus (Bilirubin, Dichte, Eiweiss, Ketonkörper, Leukozyten, Nitrit, pH, Urobilinogen).

Dankenswerterweise stellte das Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg die jeweils den Proben entsprechenden Biopsiebefunde zur Verfügung. So konnte eine Aussage über Vorliegen und Ausmaß einer Abstoßungsreaktion gewonnen werden.

3 Ergebnisse

3.1 12(S)-HETE

3.1.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Wie in der folgenden Boxplot-Darstellung (Abb. 3.1.1) zu sehen ist, liegen die Werte der Gruppe A vor einer Abstoßung auf einem etwas höheren Niveau als während einer histologisch gesicherten Rejektion, es besteht allerdings keine Signifikanz ($p=0,48$). Nach erfolgter Abstoßung in Gruppe B ist ein leichter Anstieg der 12(S)-HETE-Konzentration zu erkennen. Der Unterschied zwischen diesen Werten ist jedoch ebenfalls nicht signifikant ($p=0,67$). Die Vergleiche zwischen Abstoßungswerten und zeitlich entsprechenden Kontrollgruppenwerten zeigen keine signifikanten Unterschiede (Gruppe A: $p=0,50$; Gruppe B: $p=0,31$).

	A - 14 d	B - 14 d	C - 14 d	A - 3 m	B - 3 m	C - 3 m
Quartil Q1	116,6	125,8	109,8	59,0	125,1	118,3
Median	184,8	216,2	150,1	92,9	243,7	150,1
Quartil Q3	264,3	274,9	219,5	334,5	303,1	277,4

Tab. 3.1.1: Wertetabelle 12(S)-HETE, Konzentration in ng/10mg Kreatinin (entsprechend Abb. 3.1.1)

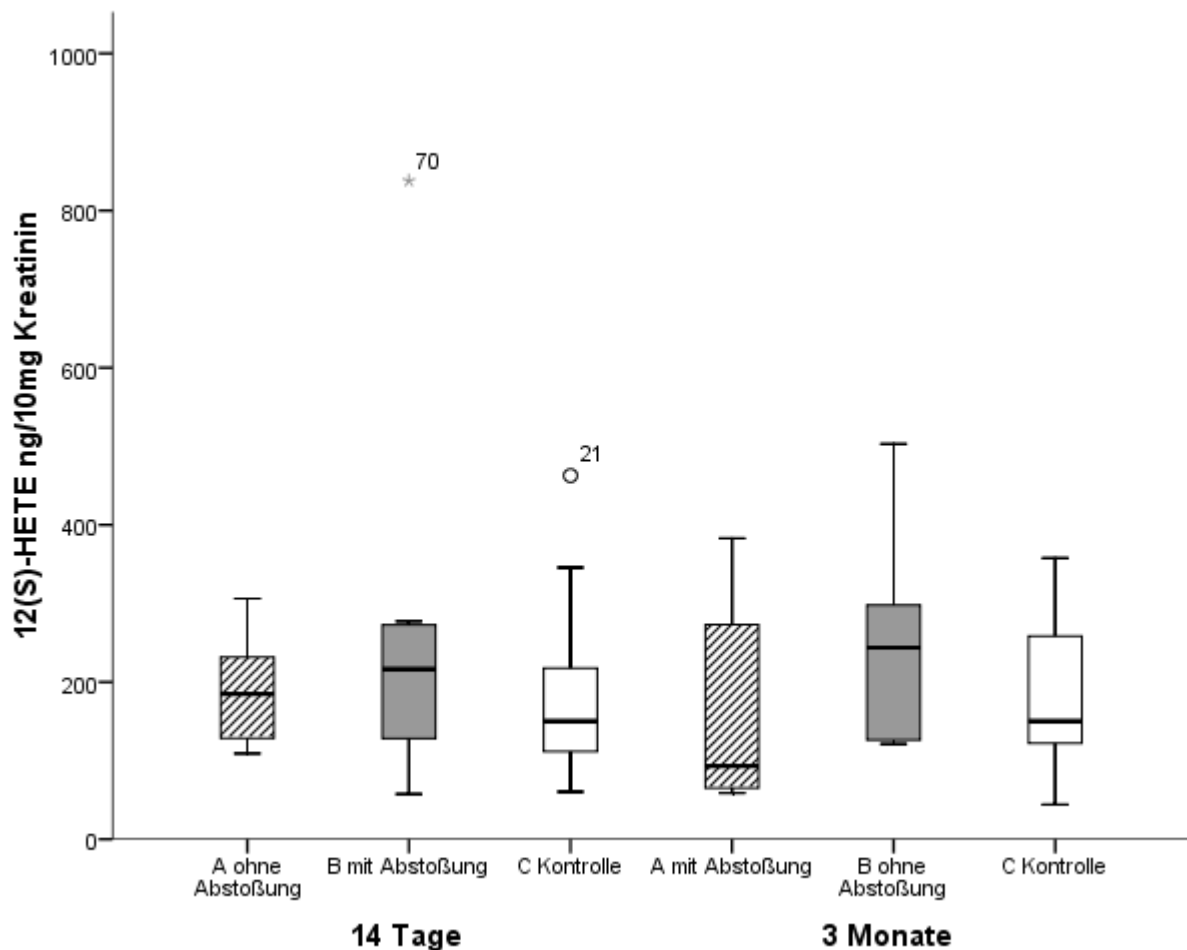


Abb. 3.1.1: 12(S)-HETE-Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation. Die einzelnen Punkte mit Zahlen entsprechen den Probennummern der jeweiligen Ausreißer.

3.1.2 Auswertung klinischer Daten

Ein Zusammenhang von essentieller Hypertonie und der Ausscheidung von 12-HETE konnte bereits gezeigt werden (Gonzalez-Nunez 2001). Vergleicht man nun die gewonnenen Messwerte aller Patienten mit den systolischen (Abb. 3.1.2) und diastolischen (Abb. 3.1.3) Blutdruckwerten zum Zeitpunkt der Probengewinnung, so ist eine verwertbare Korrelation nicht feststellbar ($p=0,60$ bzw. $p=0,91$, Tab. 3.1.2).

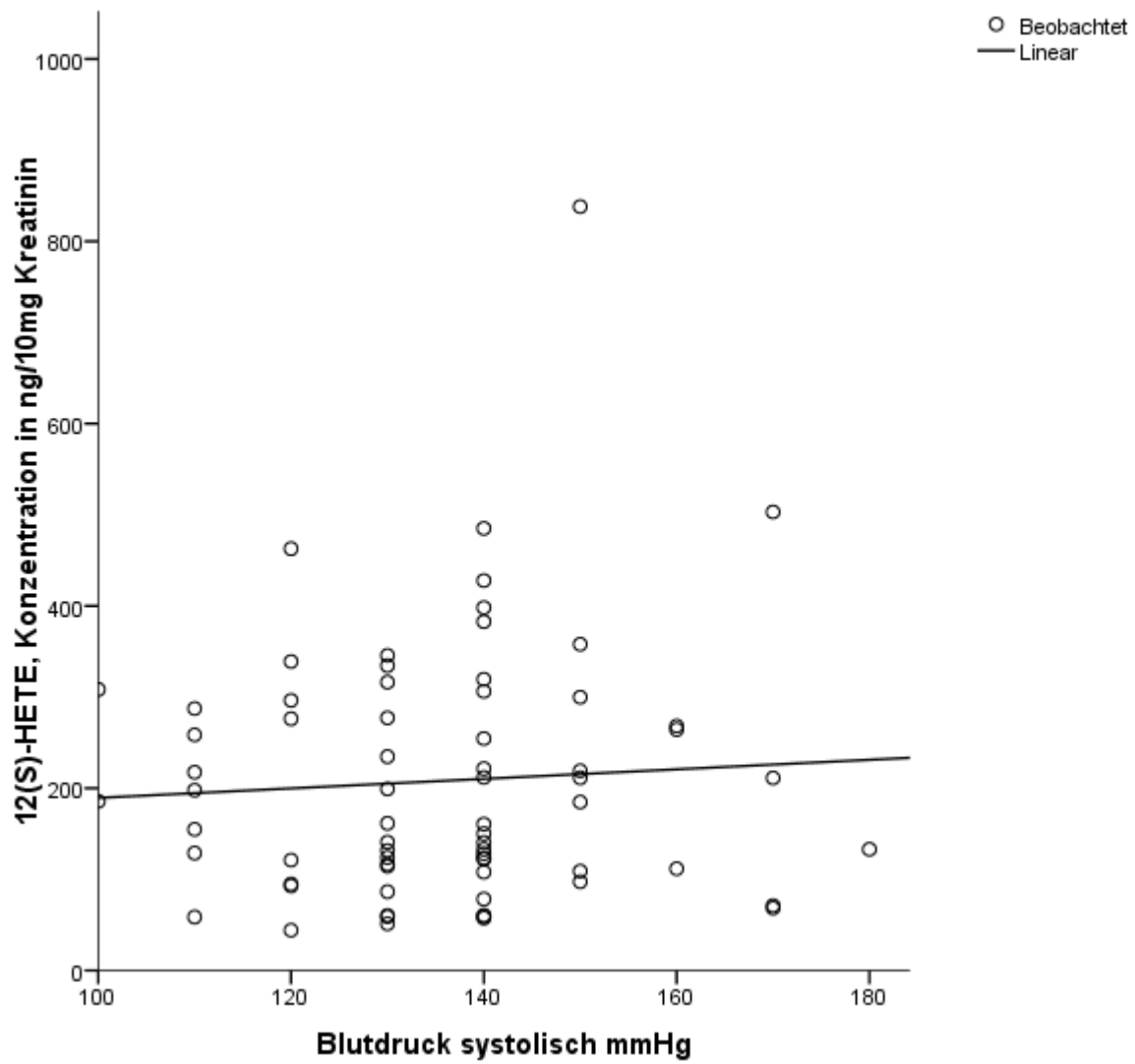
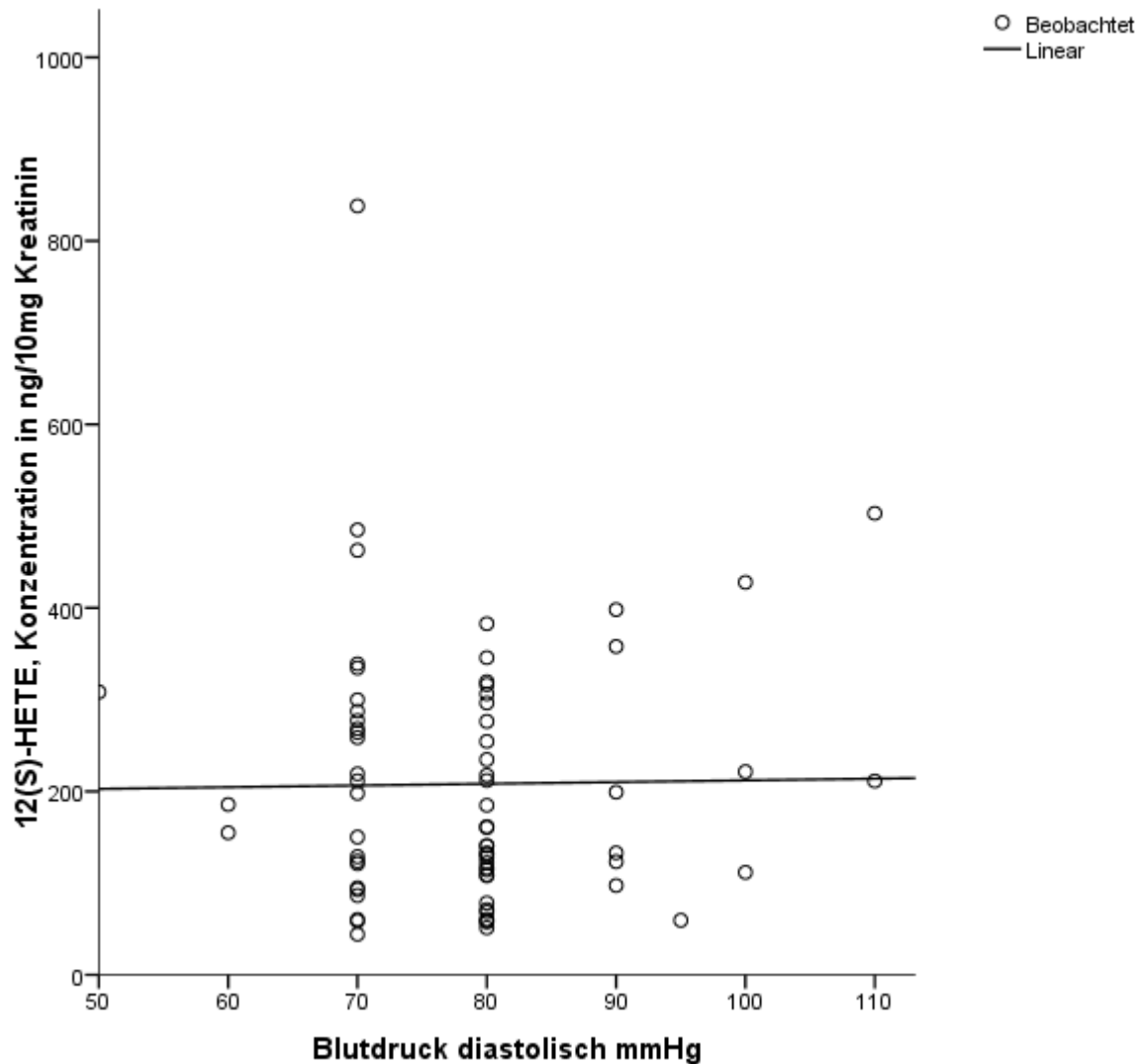


Abb. 3.1.2: Urinkonzentration von 12(S)-HETE und systolische Blutdruckwerte mit eingezeichneter Regressionsgerade



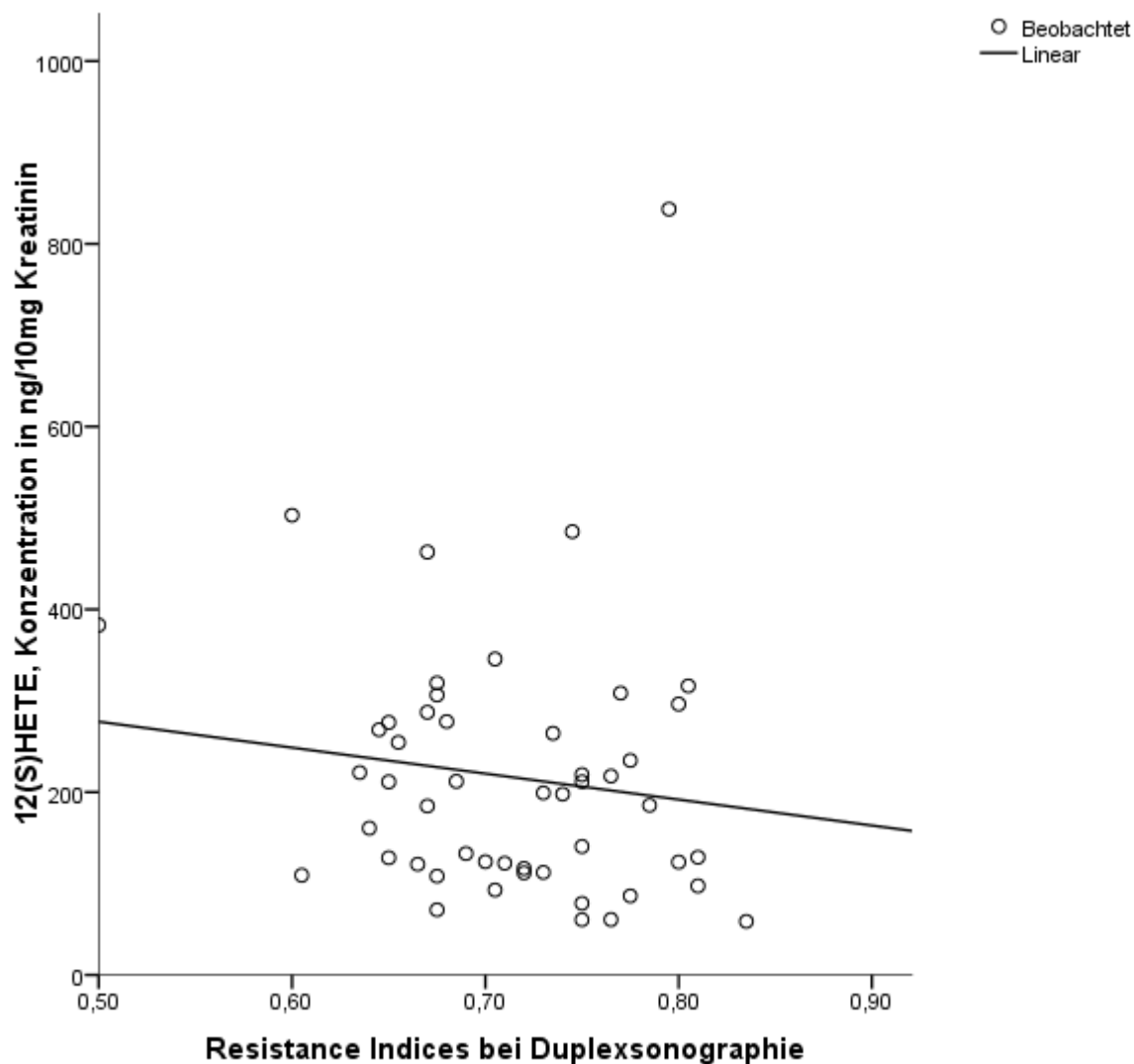


Abb. 3.1.4: Urinkonzentration von 12(S)-HETE und Resistance-Indices mit eingezeichneter Regressionsgerade

Parameter	Korrelation nach Pearson	p-Wert
Blutdruck systolisch	0,064	0,60
Blutdruck diastolisch	0,014	0,91
Resistance Indices	-0,13	0,36

Tab. 3.1.2: Korrelation von klinischen Parametern mit der Urinkonzentration von 12(S)-HETE in Ergänzung zu den Abbildungen 3.1.2-3.1.4. Korrelationen nach Pearson, signifikante zweiseitige Korrelation ab $p < 0,05$

Die Testung auf signifikante Korrelationen zeigte außerdem eine positive Korrelation mit Serumkreatinin (Korrelation 0,273, $p = 0,02$).

3.2 15(S)-HETE

3.2.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Wie in Abbildung 3.2.1 erkennbar, liegen die Werte in Gruppe A vor einer Abstoßung auf einem höheren Niveau als zum Zeitpunkt der Abstoßung, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,20$). Nach einer erfolgten Abstoßung steigen die Werte in Gruppe B etwas an ($p=0,55$). Betrachtet man die Messwerte der Kontrollgruppe sowohl 14 Tage als auch 3 Monate nach Transplantation, so muss man feststellen, dass hier eine große Streubreite vorliegt. Insgesamt liegen die Werte jedoch niedriger als in der Abstoßungsgruppe. Die Vergleiche zwischen Abstoßungswerten und zeitlich entsprechenden Kontrollgruppenwerten zeigen jedoch keine signifikanten Unterschiede (Gruppe A: $p=0,41$; Gruppe B: $p=1,00$).

	A - 14 d	B - 14 d	C - 14 d	A - 3 m	B - 3 m	C - 3 m
Quartil Q1	70,8	53,8	66,6	59,3	67,1	31,8
Median	161,6	95,8	97,4	86,9	104,4	51,8
Quartil Q3	235,9	212,2	114,1	136,3	229,2	128,6

Tab. 3.2.1: Wertetabelle 15(S)-HETE, Konzentration in ng/10mg Kreatinin (entsprechend Abb. 3.2.1)

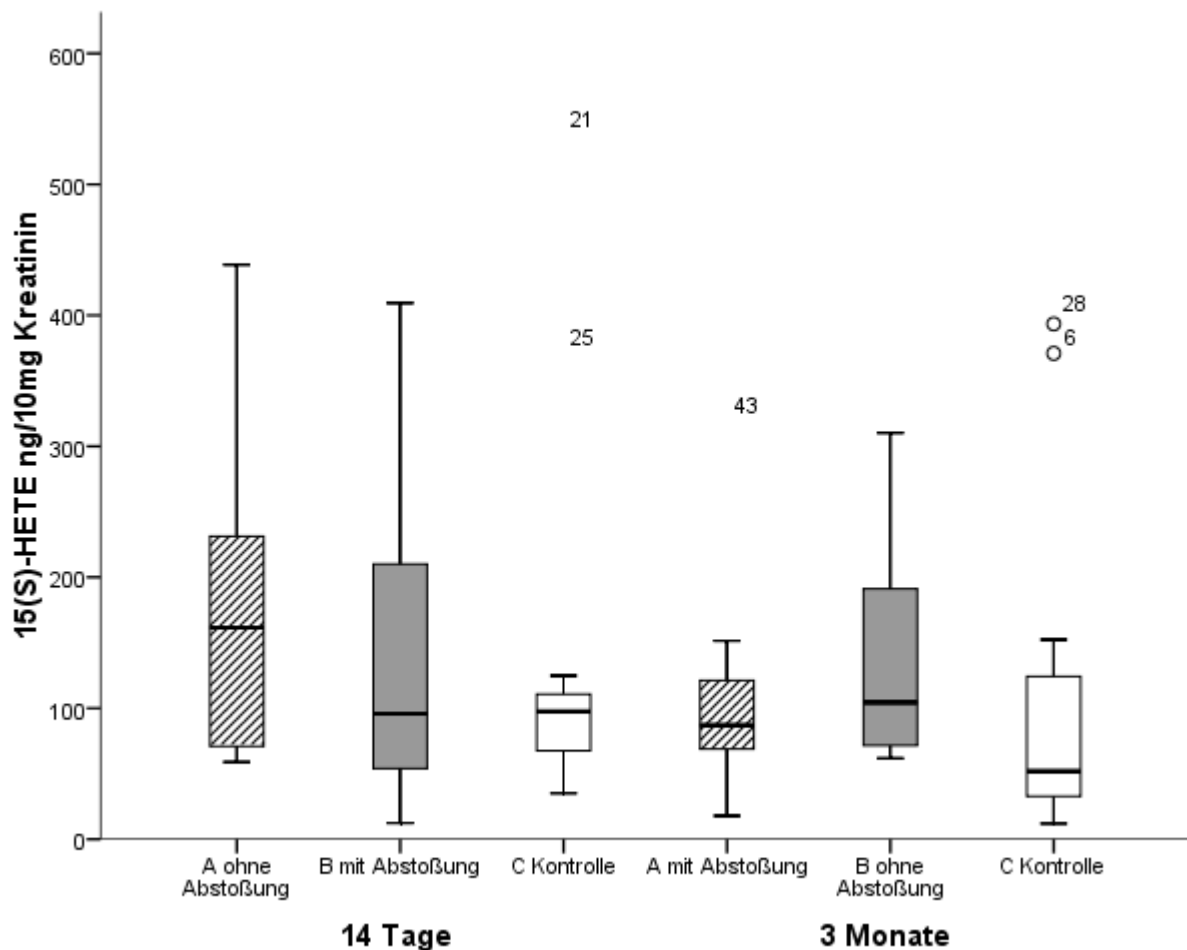


Abb. 3.2.1: 15(S)-HETE-Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation. Die einzelnen Punkte mit Zahlen entsprechen den Probennummern der jeweiligen Ausreißer.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen Messwerte im Verlauf zeigt, dass die Werte vor Abstoßung zum Zeitpunkt während der Abstoßung hin sinken (Abb. 3.2.2). Abgesehen von einem gegenläufigen Messwertepaar sind die Werte während Abstoßung auf einem niedrigeren Level oder zeigen allenfalls einen sehr diskreten Anstieg. Dieses Verhalten weist jedoch keine Signifikanz auf ($p=0,17$).

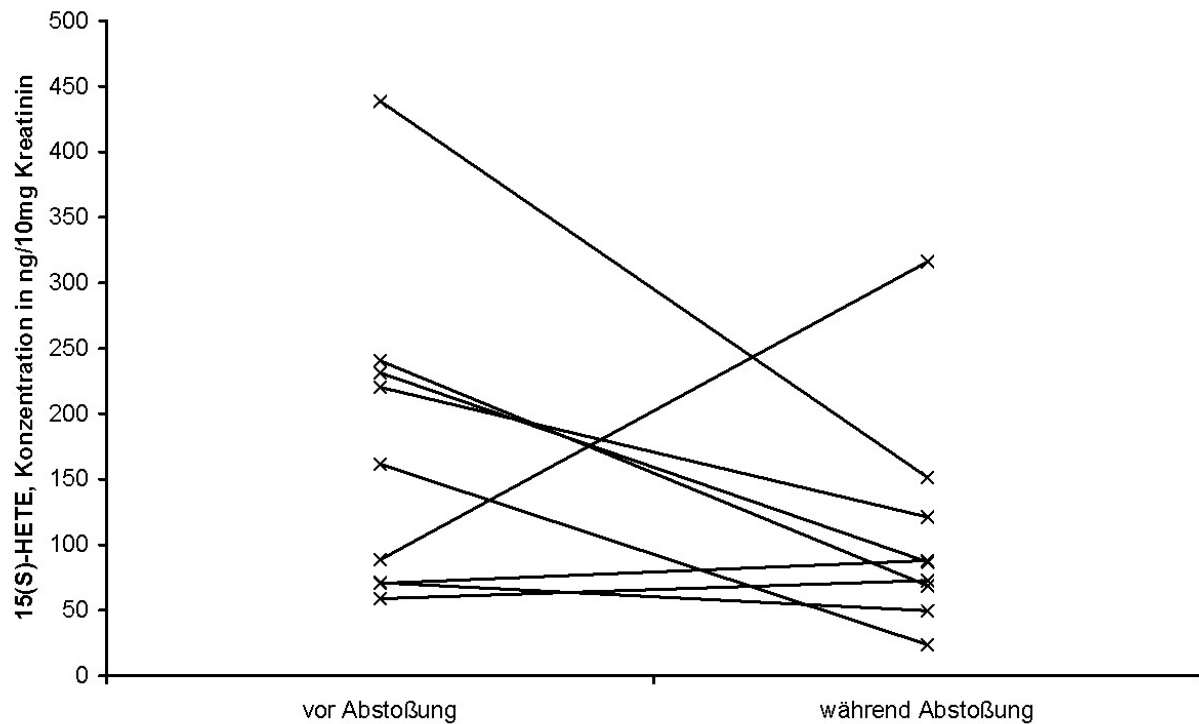


Abb. 3.2.2: Betrachtung der einzelnen Messwerte vor und während einer Abstoßungsreaktion (Patientengruppe initial ohne Abstoßung)

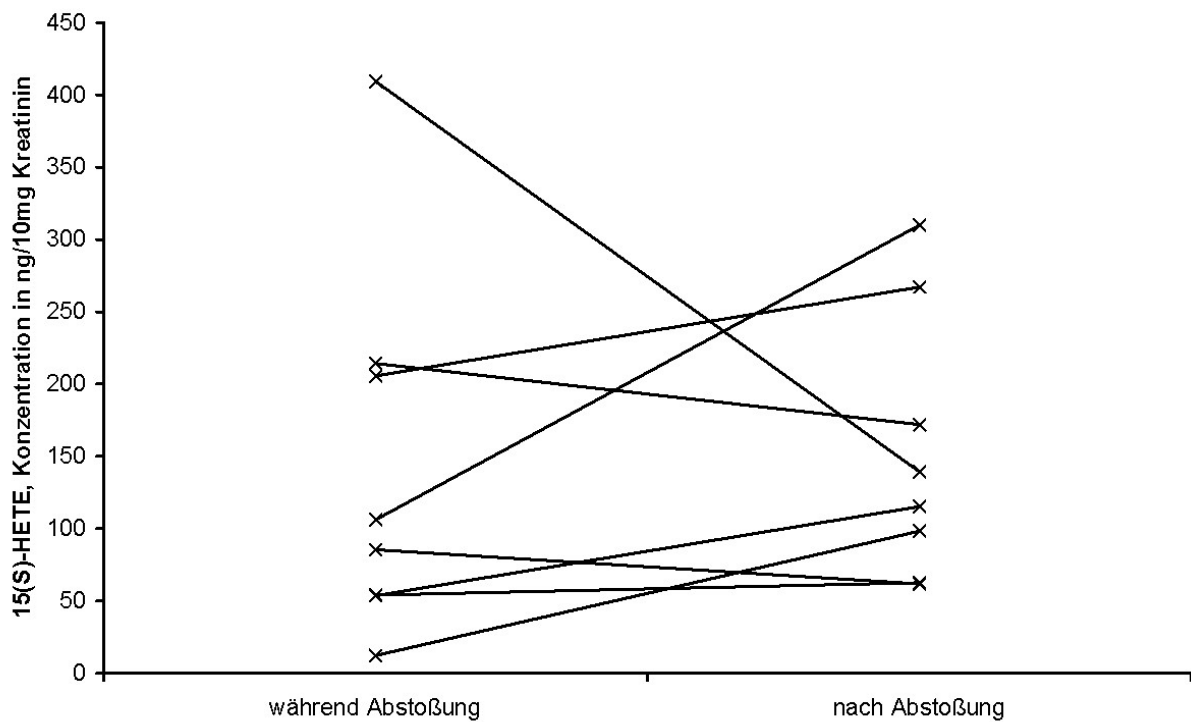


Abb. 3.2.3: Betrachtung der einzelnen Messwerte während und nach einer Abstoßungsreaktion (Patientengruppe mit initialer Abstoßung)

Die Gruppe der Patienten, von denen Proben während und nach Abstoßung gemessen wurden, zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 3.2.3). Im Verlauf nach einer Abstoßung steigen die Werte in den meisten Fällen an ($p=0,48$).

Abstoßung	Z-Wert	p-Wert
vor - während	-1,36	0,17
während - nach	-0,7	0,48

Tab. 3.2.2: Wilcoxon-Test, Vergleich der Messwerte von 15(S)-HETE im zeitlichen Verlauf. Der p-Wert wird aus dem Z-Wert berechnet. Zweiseitiger Signifikanztest, Signifikanz ab $p<0,05$.

3.2.2 Auswertung klinischer Daten

Beim Vergleich der Messwerte von 15(S)-HETE mit den klinischen Parametern fällt eine Korrelation mit Serumkreatinin auf (Abb. 3.2.4). So zeigen sich bei höheren Serumkreatinin-Werten auch erhöhte 15(S)-HETE-Konzentrationen. Diese Erscheinung zeigt eine signifikante Korrelation ($p=0,014$, Tab. 3.2.3). Für diese Beziehung wurden die Messwerte aller Patienten verwendet.

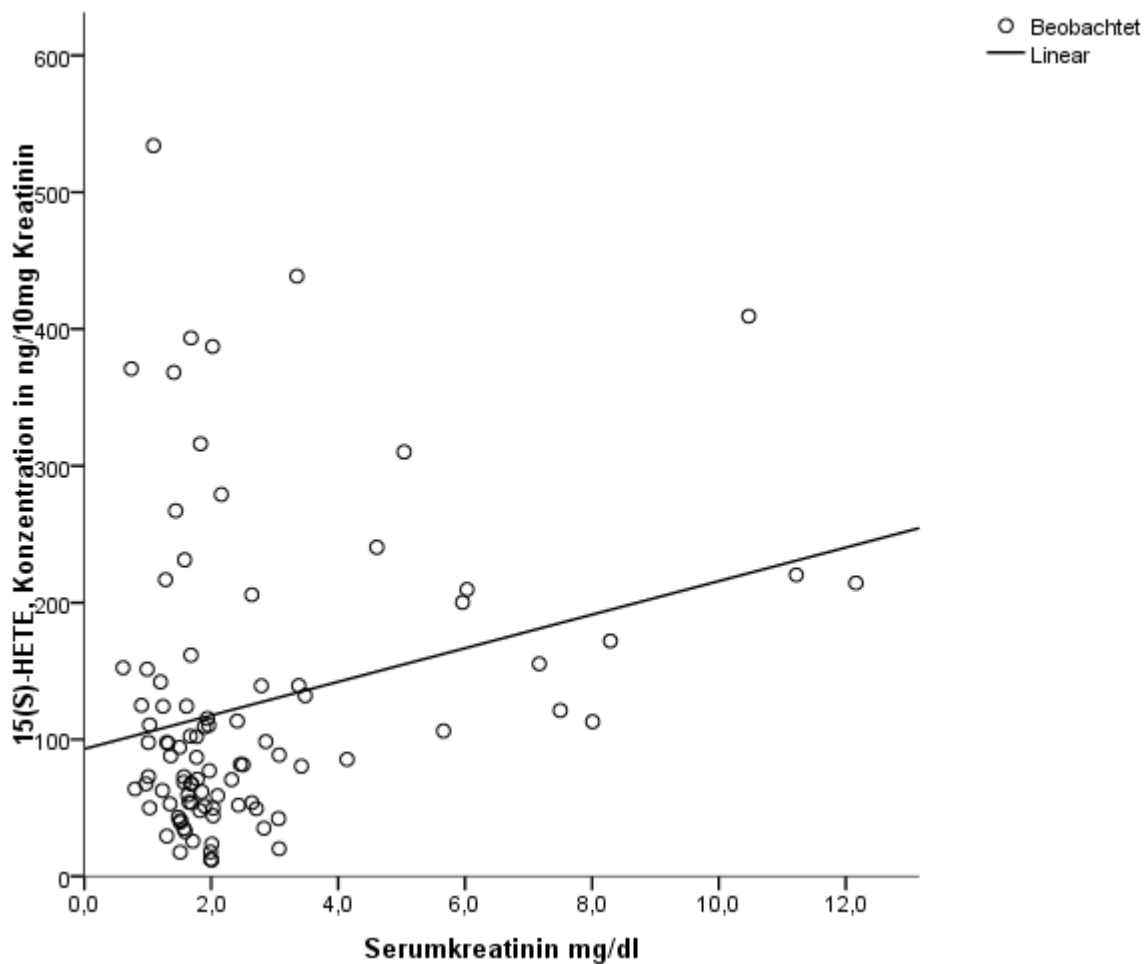


Abb. 3.2.4: 15(S)-HETE und Serumcreatinin mit eingezeichneter Regressionsgerade

Vergleich	Korrelation nach Pearson	p-Wert
15(S)-HETE - Serumcreatinin	0,255	0,014*

Tab. 3.2.3: Korrelation nach Pearson, *signifikant mit $p < 0,05$

3.3 Leukotrien B₄

3.3.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Wie in Abbildung 3.3.1 zu sehen ist, liegen die Werte aller Gruppen bei teils starken Streubreiten auf einem ähnlichen Niveau. Die höchsten Werte werden in Gruppe B mit initialer Abstoßung gemessen. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe nach 3 Monaten zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,027$). Während der Abstoßung selbst nach 14 Tagen ist der Unterschied zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant ($p=0,32$). Für Gruppe

A kann während der Abstoßung ebenfalls kein signifikanter Unterschied mit der Kontrollgruppe ermittelt werden ($p=0,65$).

	A - 14 d	B - 14 d	C - 14 d	A - 3 m	B - 3 m	C - 3 m
Quartil Q1	4,5	7,1	6,4	4,1	10,4	4,8
Median	6,8	14,9	7,7	6,6	14,0	6,7
Quartil Q3	13,5	25,5	24,2	10,3	18,8	9,1

Tab. 3.3.1: Wertetabelle LTB₄, Konzentration in ng/100mg Kreatinin (entsprechend Abb. 3.3.1)

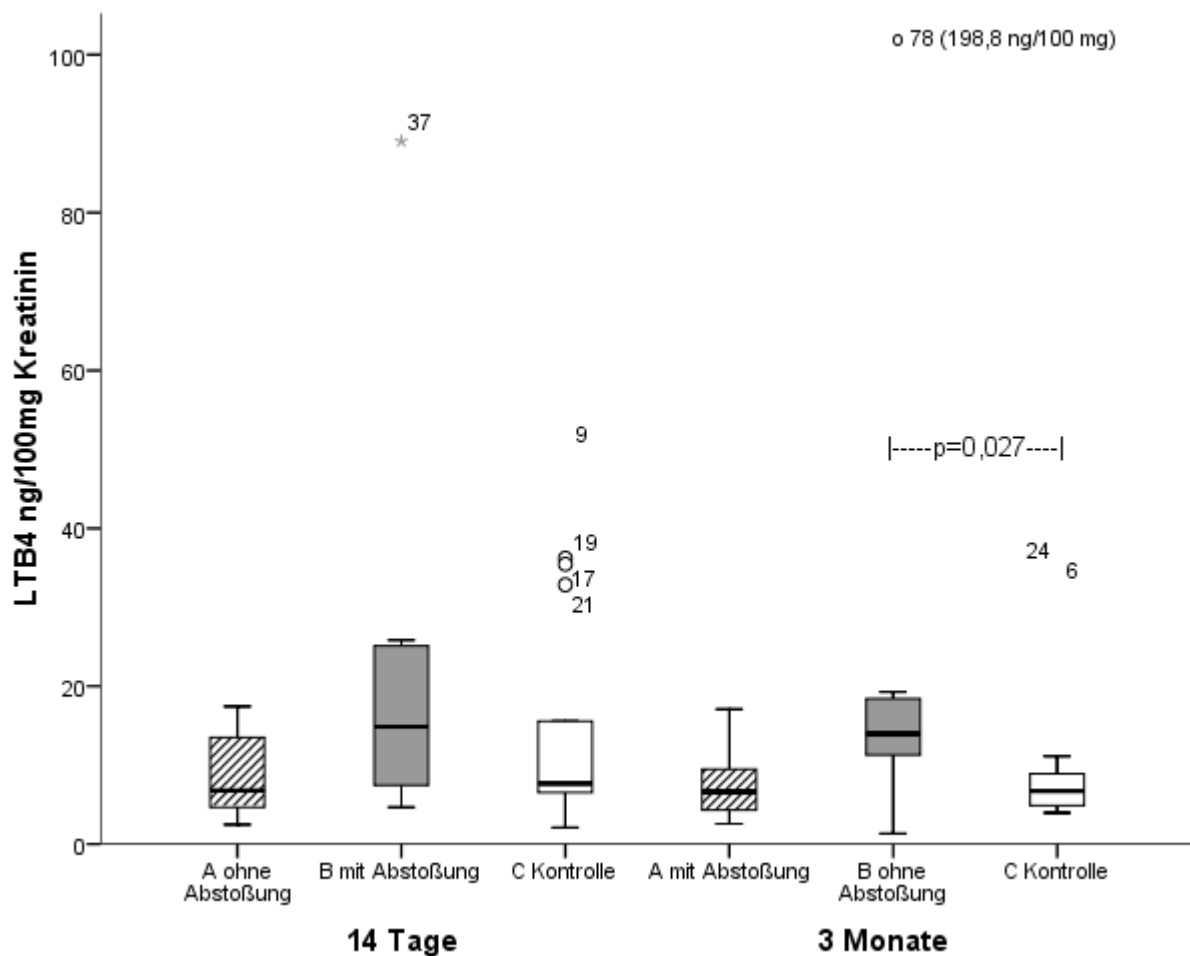


Abb. 3.3.1: Leukotrien-B₄-Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation. Die einzelnen Punkte mit Zahlen entsprechen den Probennummern der jeweiligen Ausreißer.

3.3.2 Auswertung klinischer Daten

Es erfolgte ein Abgleich mit klinischen Parametern. Beim Vergleich aller ermittelten Leukotrien-B₄-Konzentrationen mit der jeweiligen Körpertemperatur zum Zeitpunkt der Probengewinnung (Abb. 3.3.2) kann festgestellt werden, dass bei höheren Körpertemperaturen höhere Leukotrien-B₄-Werte gemessen werden. Diese Korrelation zeigt eine hohe Signifikanz nach Pearson ($p=0,003$, Tab. 3.3.2). Ein Zusammenhang mit Entzündungsparametern (Leukozytenzahlen im Blutbild, CRP) konnte allerdings nicht gefunden werden ($p=0,55$ bzw. $p=0,59$).

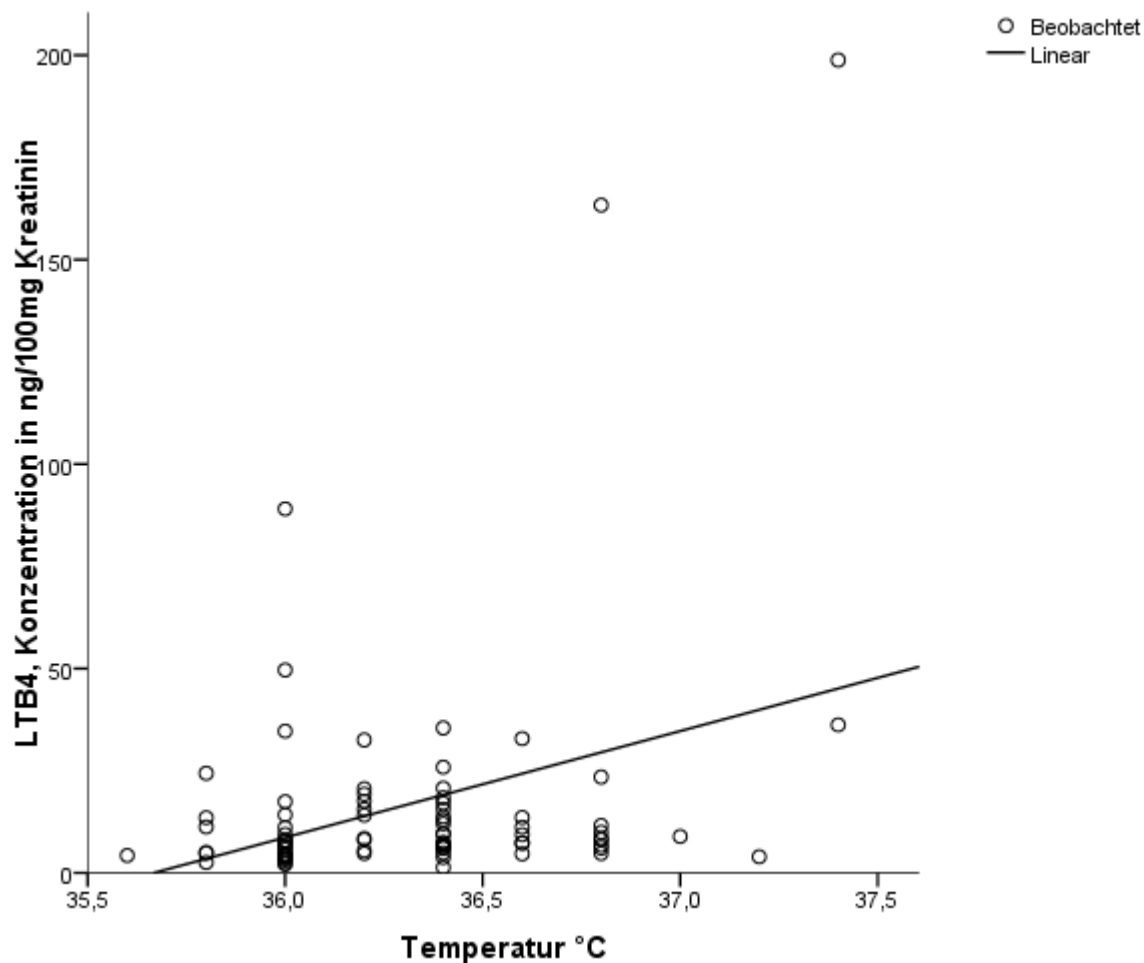


Abb. 3.3.2: Leukotrien B₄ und Körpertemperatur mit eingezeichneter Regressionsgerade

Vergleich	Korrelation nach Pearson	p-Wert
Leukotrien B ₄ - Körpertemperatur	0,33	0,003**

Tab. 3.3.2: Korrelation nach Pearson, **hoch signifikant mit $p<0,01$

3.4 Leukotrien E₄

3.4.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Die Darstellung der Messwerte von Leukotrien E₄ in Bezug auf eine Abstoßungsreaktion zeigt eine große Streubreite der Konzentrationen bei Messung vor einer Abstoßung (Gruppe A, Abb. 3.4.1). Insgesamt scheinen die Werte zwar auf einem höheren Niveau zu liegen als während einer Abstoßung, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,35$). Auch der Vergleich der Werte nach erfolgter Abstoßung in Gruppe B zeigt keine eindeutige Tendenz ($p=0,35$). Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Abstoßungswerten und der zeitlich entsprechenden Kontrollgruppe (Gruppe A: $p=0,85$; Gruppe B: $p=0,72$).

	A - 14 d	B - 14 d	C - 14 d	A - 3 m	B - 3 m	C - 3 m
Quartil Q1	14,6	9,6	15,3	8,4	8,6	12,1
Median	16,4	21,5	22,4	14,6	36,2	16,2
Quartil Q3	132,2	38,2	31,5	59,6	82,8	35,2

Tab. 3.4.1: Wertetabelle LTE₄, Konzentration in ng/100mg Kreatinin (entsprechend Abb. 3.4.1)

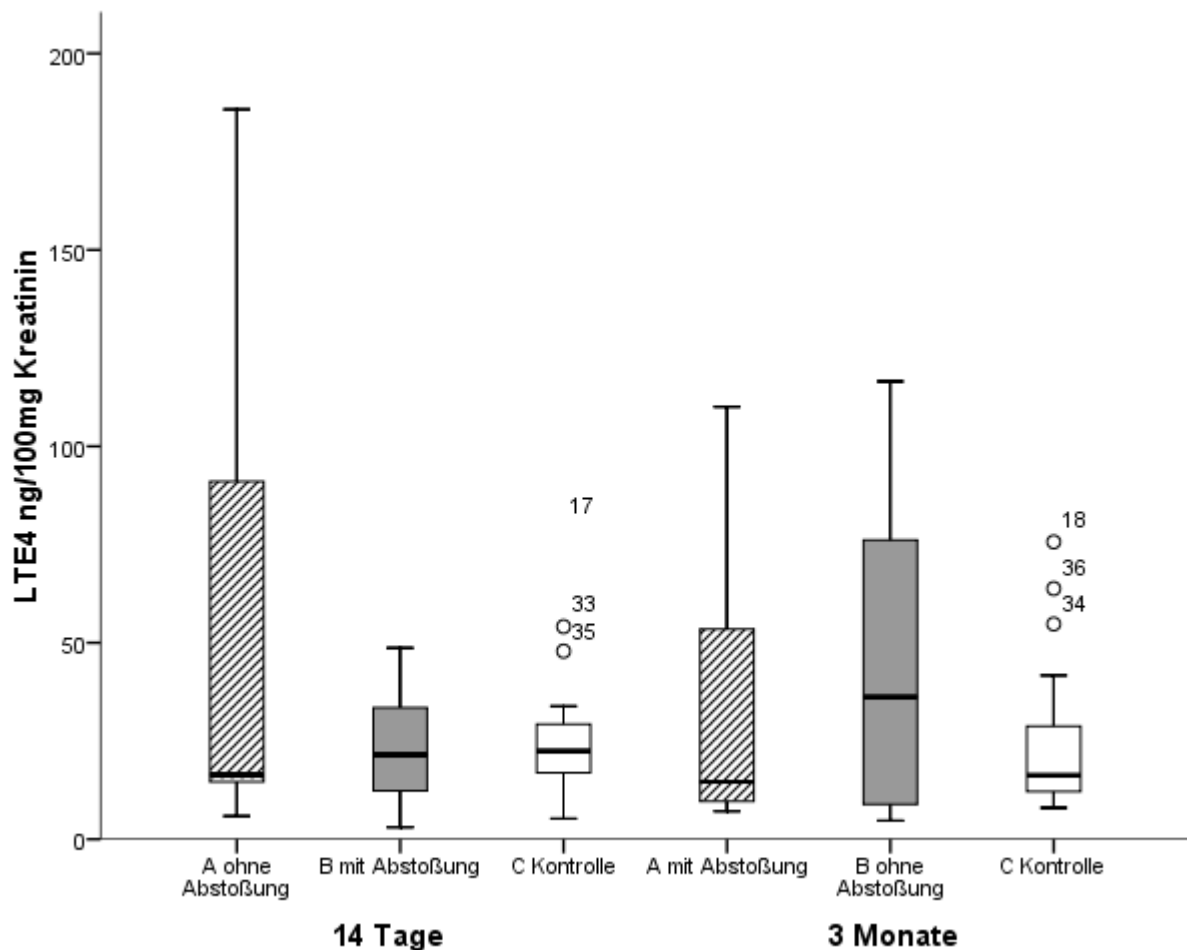


Abb. 3.4.1: Leukotrien- E_4 -Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation. Die einzelnen Punkte mit Zahlen entsprechen den Probennummern der jeweiligen Ausreißer.

3.4.2 Auswertung klinischer Daten

Da bei Cyclosporin-A-bedingter Nephrotoxizität eine erhöhte Ausscheidung von Leukotrien E_4 festgestellt werden konnte (Butterly 2000), war dieser Vergleich von besonderem Interesse. Der Vergleich der Proben von Patienten unter Cyclosporin-A-Therapie mit denen von Tacrolimus zeigt ganz deutlich ($p=0,00$) erhöhte Messwerte in der Cyclosporin-Gruppe (Abb. 3.3.3). Eine direkte Korrelation mit Serumspiegeln von Tacrolimus ($p=0,71$) konnte jedoch nicht festgestellt werden.

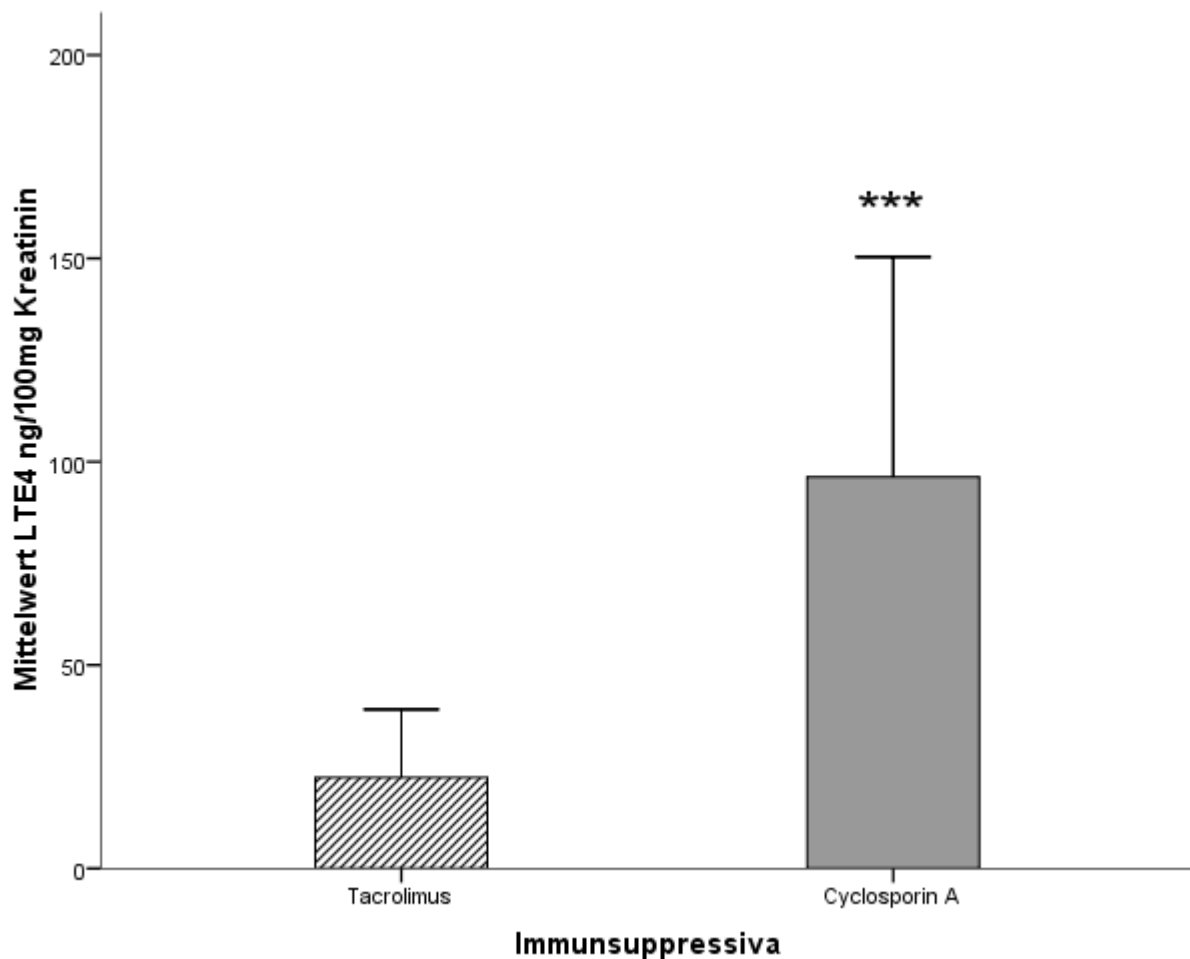


Abb. 3.4.2: Unterschied der Urinkonzentrationen von Leukotrien E4 in ng/100mg Kreatinin bei Behandlung mit verschiedenen Immunsuppressiva. *** Es besteht ein hochsignifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test.

	Mittelwert LTE ₄	Standardabweichung
Tacrolimus (n=79)	22,4	16,7
Cyclosporin A (n=11)	96,3	54,1

Tab. 3.4.2: Vergleich der Mittelwerte von Leukotrien E4 in ng/100mg Kreatinin bei Patienten mit verschiedenen Immunsuppressiva. Einbezogen wurden alle gemessenen Proben.

3.5 Prostaglandin E Metaboliten

3.5.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Wie in Abbildung 3.5.1 ersichtlich, befinden sich die Konzentrationen in beiden Abstoßungsgruppen (A und B) sowohl während als auch vor bzw. nach Abstoßung auf einem höheren Niveau als in beiden Kontrollgruppen. Bei der Testung auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des U-Tests nach Mann und Whitney zeigten sich beim Vergleich der Abstoßungsgruppen mit der Kontrollgruppe nach 14 Tagen z. T. hochsignifikante Unterschiede (Gruppe A: $p=0,037$; Gruppe B: $p=0,005$). Auch nach 3 Monaten liegen die Abstoßungsgruppen auf einem deutlich höheren Niveau, auch wenn diese Unterschiede nicht signifikant sind (Gruppe A: $p=0,06$; Gruppe B: $p=0,22$). Während in Gruppe A keine bedeutende Veränderung der Werte im zeitlichen Verlauf zu sehen ist ($p=0,92$), liegen die Werte von Gruppe B nach erfolgter und therapierter Abstoßung auf einem etwas niedrigeren Level ($p=0,17$).

	A - 14 d	B - 14 d	C - 14 d	A - 3 m	B - 3 m	C - 3 m
Quartil Q1	20,9	32,2	10,5	19,0	16,7	9,5
Median	35,5	35,9	17,4	41,6	29,9	19,4
Quartil Q3	73,5	62,6	28,3	75,0	47,5	27,0

Tab. 3.5.1: Wertetabelle PGEM, Konzentration in ng/100mg Kreatinin (entsprechend Abb. 3.5.1)

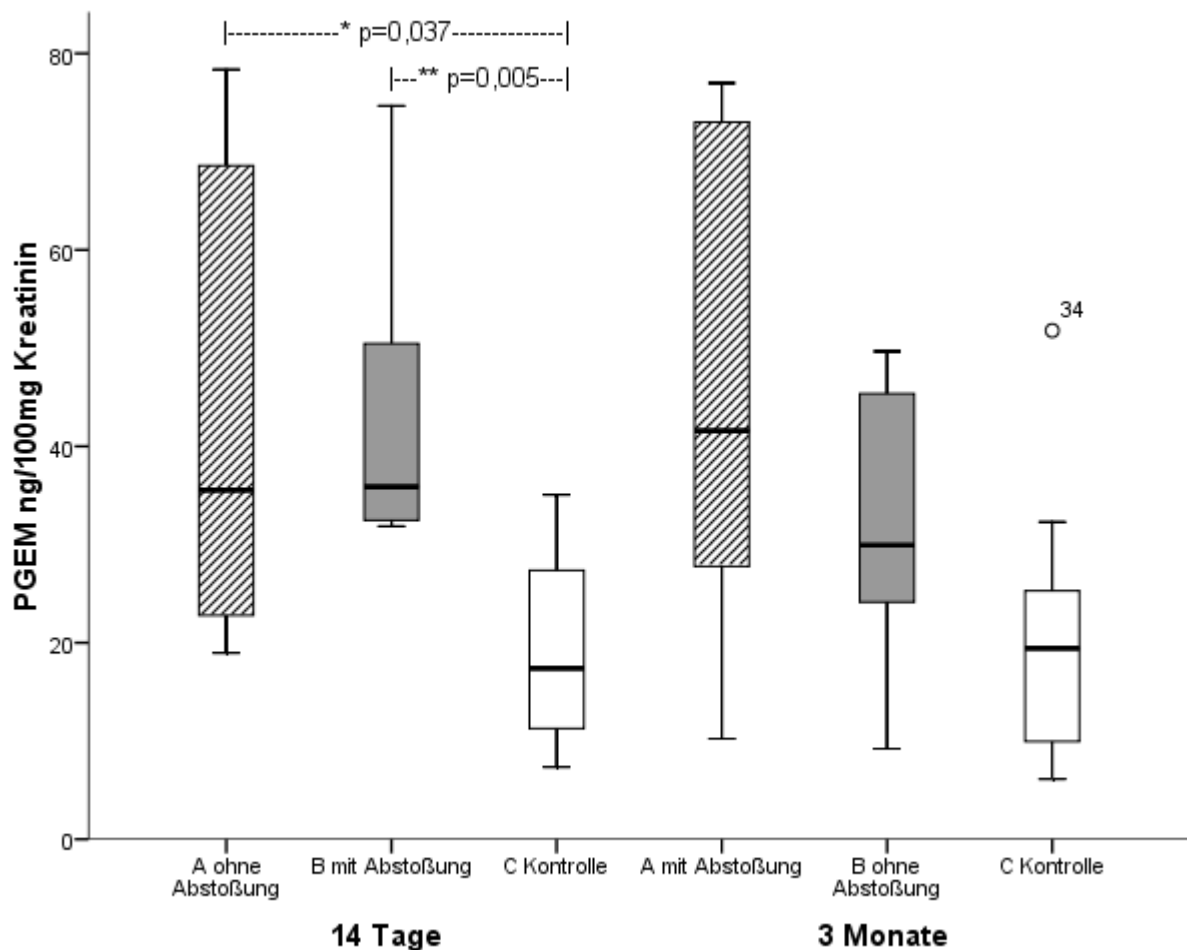


Abb. 3.5.1: Prostaglandin-E-Metaboliten-Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation. Der einzelne nummerierte Punkt entspricht der Probennummer des Ausreißers. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind mit einer Klammer und den jeweiligen p-Werten gekennzeichnet.

3.5.2 Auswertung klinischer Daten

Der Vergleich von Prostaglandin E Metaboliten mit klinischen Parametern ergab keine signifikanten Resultate für die Korrelation mit Serumkreatinin ($p=0,88$), CRP ($p=0,45$), Leukozytenzahl im Blutbild ($p=0,57$), Blutdruckwerten ($p=0,70$), Resistance Indices ($p=0,56$) und Körpertemperatur ($p=0,41$).

3.6 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$

3.6.1 Beziehung zu einer Abstoßung

Die Ergebnisse für Prostaglandin $F_{1\alpha}$ zeigen keine signifikante Zusammenhänge zwischen Abstoßungswerten und zeitlich entsprechenden Kontrollgruppenwerten (Gruppe A: $p=1,00$; Gruppe B: $p=0,39$). Auf Grund der geringen Probenzahl (siehe Tab. 2.1) wird in Abbildung 3.6.1 an Stelle der Boxplot-Darstellung ein Punktdiagramm verwendet.

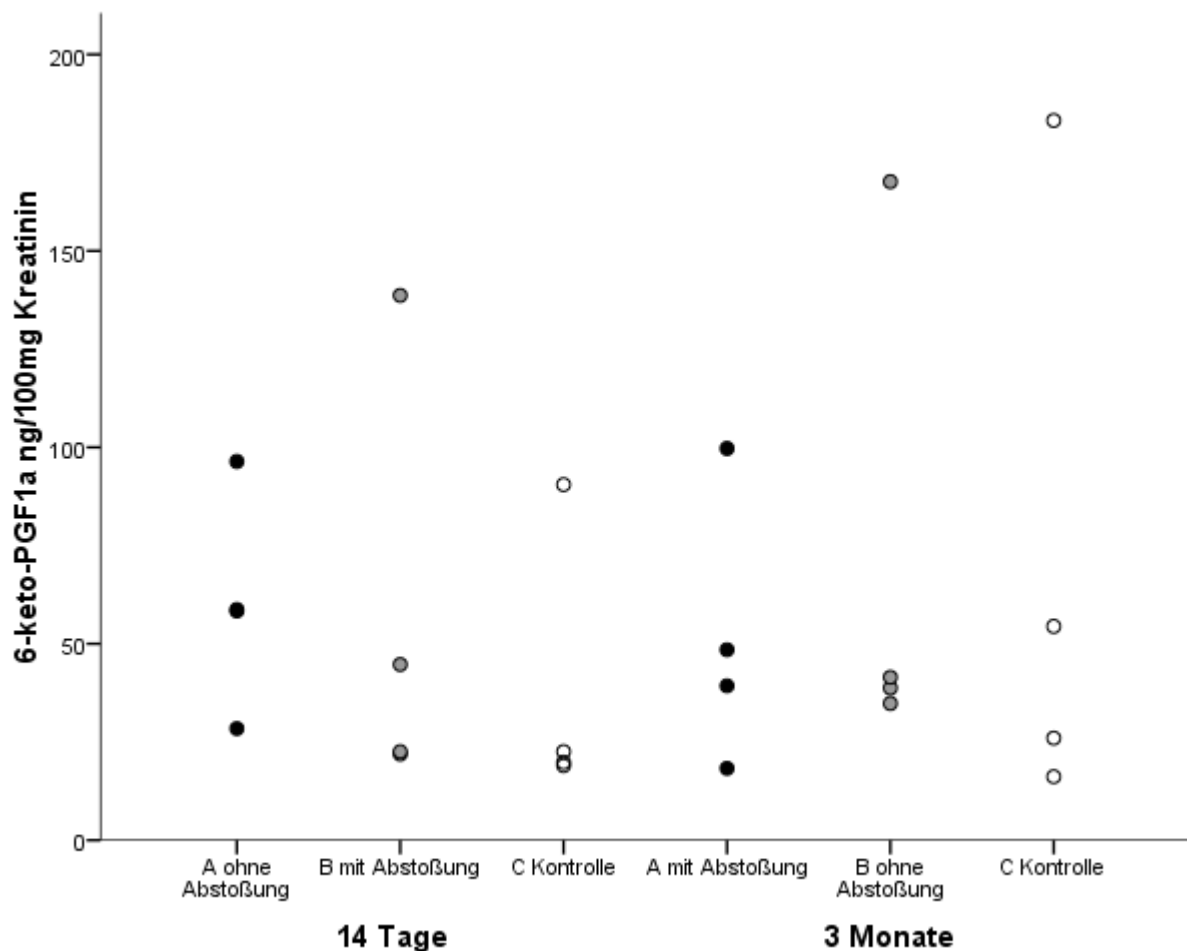


Abb. 3.6.1: 6-keto-Prostaglandin- $F_{1\alpha}$ -Urinkonzentration in Beziehung zur Transplantatabstoßung als Punktdiagramm. Dargestellt sind die Abstoßungsgruppen A und B mit Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Kontrollgruppe C ohne Abstoßung im zeitlichen Verlauf nach Nierentransplantation.

3.6.2 Auswertung klinischer Daten

Ein Zusammenhang zwischen Tacrolimus-Behandlung und einer verminderten Expression der Cyclooxygenase-2 konnte bereits gezeigt werden (Höcherl 2002). Bei höheren Serumspiegeln von Tacrolimus wurde nun eine niedrigere Konzentration von Prostaglandin $F_{1\alpha}$ im Urin gemessen. (Abb. 3.6.2).

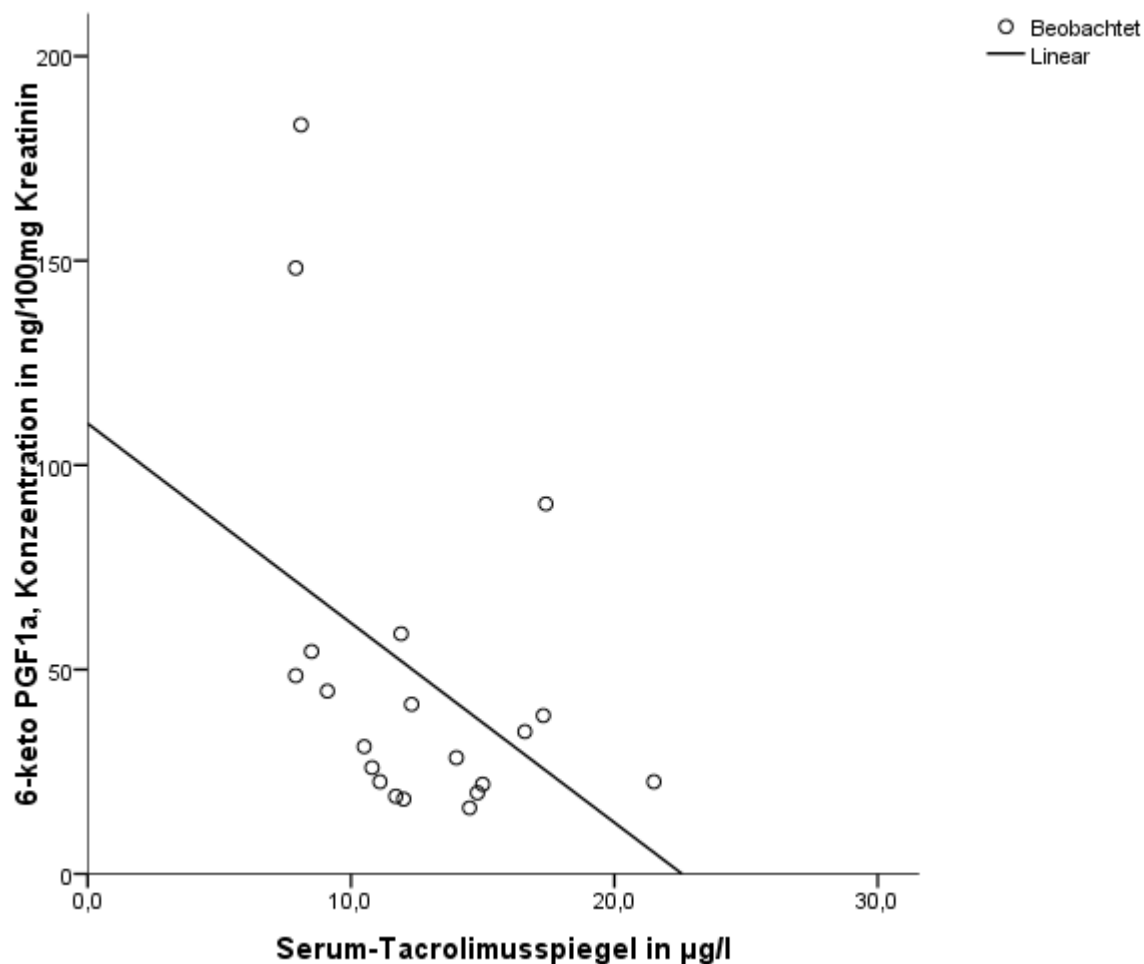


Abb. 3.6.2: 6-keto Prostaglandin $F_{1\alpha}$ und Serumspiegel von Tacrolimus mit eingezeichneter Regressionsgerade. Trotz des hohen Korrelationswertes (0,41) ist dieser Zusammenhang bei zweiseitiger Prüfung knapp nicht signifikant ($p=0,073$, Tab. 3.6.2).

Vergleich	Korrelation nach Pearson	p-Wert
6-keto PGF $_{1\alpha}$ - Tacrolimus	0,41	0,073

Tab. 3.6.2: Korrelation nach Pearson, zweiseitige Signifikanz ab $p<0,05$

4 Diskussion

In der Fachliteratur gibt es bisher keine Daten über einen Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Leukotrienen und HETEs mit einer erfolgten Transplantatabstoßung. Eine mögliche Beziehung zwischen der Prostaglandin E₂-Ausscheidung und einer Abstoßungsreaktion konnte früher bereits gezeigt werden (Ladefoged 1987). Im folgenden sollen nun die gewonnenen Ergebnisse bewertet und ein Bezug zu bereits durchgeführten Untersuchungen hergestellt werden. Zu Beginn der Ausführung erfolgt eine kritische Betrachtung der angewendeten Methodik.

4.1 Methodik

4.1.1 Patientenkollektiv und Proben

Die ausgewählten Proben wurden innerhalb eines Zeitraums von drei Jahren gesammelt. Das Verhältnis der Geschlechter ist ausgewogen, wenngleich etwas mehr Proben von männlichen Patienten gemessen wurden (21 männlich, 13 weiblich). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte eine höhere Prävalenz von Nierentransplantationen bei Männern in Wales (van Woerden 2007). Eine ältere Untersuchung aus dem Eurotransplant-Land Belgien zeigt ebenfalls eine deutliche Überzahl (m=452, w=289) von männlichen Transplantatempfängern (Vereerstraeten 1999). Auch der Vergleich mehrerer Studien vorwiegend aus dem anglo-amerikanischen Raum bestätigt durchweg eine höhere Transplantationsrate bei Männern (Jindal 2005).

Das Durchschnittsalter unserer Patienten ($47,9 \pm 13,9$) ist ebenfalls mit Werten aus großen Kollektiven vergleichbar. Im Zeitraum zwischen 1997-2006 betrug beispielsweise in Kanada das mittlere Alter der Empfänger bei Lebendspenden $45,4 \pm 13,1$ und bei postmortalen Spenden $51,9 \pm 12,7$ (Canadian Institute for Health Information 2008).

Auch die immunsuppressive Behandlung, die vorwiegend mit einer Kombination aus Tacrolimus und Mycophenolatmofetil erfolgte, entspricht dem momentan gängigen Vorgehen. Daten aus den USA zufolge kamen bei der immunsuppressiven Therapie nierentransplantierte Patienten im Jahr 2005 insbesondere Tacrolimus (78,7 %) und Mycophenolatmofetil (81,8 %) zum Einsatz, während Cyclosporin A mit 14,9 % einen deutlichen geringeren Anteil hatte (OPTN/SRTR 2006).

Somit kann in unserer Untersuchung durchaus von einer repräsentativen Stichprobe ausgegangen werden.

Die Zahl der Proben ist vor allem von der Anzahl der erfolgten Abstoßungsreaktionen mit zugleich vorliegenden Urinproben abhängig. Trotz dieser Einschränkung konnten jedoch für die Abstoßungsgruppe Proben von 17 Patienten jeweils mit und ohne Abstoßung gesammelt werden, sowie eine Kontrollgruppe mit ebenfalls 17 Probanden. Vergleicht man diese Zahl mit veröffentlichten Messungen bei ähnlichen Fragestellungen, so zeigt sich, dass die Probenzahl durchaus adäquat ist. So untersuchten Asano et al. bei der Messung von Leukotrien E_4 im Urin bei Asthma acht Asthmapatienten und fünf Kontrollpersonen (Asano 1995). Auch bei Erkrankungen mit hoher Prävalenz kamen ähnliche Probenzahlen zum Einsatz. Für die Bestimmung der Urinkonzentrationen von 12(S)-HETE wurden Proben von 19 Patienten mit essentiellm Hypertonus und von 9 Kontrollpersonen untersucht (Gonzalez-Nunez 2001).

4.1.2 Messungen

Der Enzyme Immunoassay wurde Anfang der 70er Jahre entwickelt (van Weemen 1971), und hat sich seitdem als Methode zur Messung verschiedener Substanzen etabliert. So wurde der EIA schon bald als sensitive Messmethode für die Erkennung des Hepatitis-B-Oberflächen-Antigens entdeckt (Wolters 1976). Auch für die Messung von Eicosanoiden wurden Enzyme Immunoassays entwickelt, die sich im Vergleich zum damals schon etablierten Radioimmunoassay bei gleicher bis besserer Sensitivität als gute nicht-radioaktive Alternative erwiesen (Pradelles 1985). Die Arbeitsschritte konnten im Laufe der Zeit weiter vereinfacht werden. So zeigte sich bei der Bestimmung von Leukotrien E_4 im Urin eine Übereinstimmung der Messergebnisse von unbehandelten im Vergleich zu davor aufgereinigten Proben (Kumlin 1995), so dass eine Aufreinigung keine Voraussetzung für genaue Ergebnisse ist. Leukotrien E_4 scheint sich darüber hinaus ohne Zugabe von Konservierungsstoffen bei einer Temperatur von -20°C stabil zu verhalten (Kumlin 1995). Somit lässt sich vermuten, dass keine lagerungsbedingten Messschwankungen vorliegen dürften. Bei unseren Messungen stellte in einzelnen Fällen ein enger Messbereich der Standardkurve eine Limitation dar, die jedoch durch die Auswahl entsprechender Verdünnungen in den Griff zu bekommen war. Dies wurde im Abschnitt 2.4 ausführlich erläutert.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 12(S)-HETE

Bei der Untersuchung von abgestoßenen Fremdnieren im Tierversuch konnte in der Nierenrinde eine größere Menge 12-HETE als in entsprechenden Autotransplantaten gefunden werden (Mangino 1987). Desweiteren konnte später die Expression von 12-Lipoxygenase im Glomerulum der Niere gezeigt werden (Reinhold 2006). Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass bei einer Abstoßungsreaktion 12-HETE auch vermehrt im Urin ausgeschieden wird. Dies konnte durch unsere Messungen allerdings nicht bestätigt werden, da während einer Abstoßungsreaktion ähnliche 12(S)-HETE-Konzentrationen wie in den Gruppen ohne Abstoßung vorliegen bzw. eher eine niedrigere Konzentration während einer Abstoßung (siehe 3.1). Interessant ist jedoch, dass der in Abbildung 3.1.1 gezeigte Messwert in der Abstoßungsgruppe (Nr. 70) die Probe eines Patienten mit schwerer Abstoßungsreaktion (Banff IIa) repräsentiert, der nach Transplantation einen schwierigen klinischen Verlauf mit starker Protein- und Erythrozyturie, massiv erhöhtem Kreatininwert (10,47 mg/dl) und eine tägliche Ausscheidung von nur 90 mL Urin zeigte. Somit lässt sich vermuten, dass bei entsprechend schwerer Klinik auch ein messbarer 12(S)-HETE-Anstieg vorliegen könnte.

Ein Zusammenhang zwischen der Urinkonzentration von 12(S)-HETE und Bluthochdruck konnte bereits gezeigt werden. So wurden bei Patienten mit essentiellm Hypertonus erhöhte Urinkonzentrationen von 12(S)-HETE gemessen (Gonzalez-Nunez 2001). Der Vergleich der 12(S)-HETE-Konzentrationen sowohl mit systolischen als auch mit diastolischen Blutdruckwerten zum Zeitpunkt der Messung zeigte jedoch keine Korrelationen (Tab. 3.1.2). Dies lässt sich dadurch erklären, dass in unserer Untersuchung kein Vergleich zwischen Hypertoniepatienten und gesunden Probanden durchgeführt wurde. Somit lässt sich festhalten, dass für isoliert gemessene Blutdruckwerte eine Korrelation mit 12(S)-HETE-Konzentrationen im Urin nicht gegeben ist.

Die Ermittlung des renalen Resistance Index (Widerstandsindex, RI) beruht auf der Messung der systolischen und enddiastolischen Flussgeschwindigkeiten in den Nierenarterien (Tublin 2003). Da laut Tublin et al. ein erhöhter Pulsdruck (Differenz zwischen systolischem und diastolischem Blutdruck) positiv korreliert mit RI-Werten, käme auch ein Zusammenhang mit 12(S)-HETE in Frage. Der Vergleich (Abb. 3.1.4) zeigt allenfalls eine angedeutete negative Korrelation. Dies würde allerdings der Vermutung

widersprechen, dass bei hohen Widerständen auch größere Mengen von 12(S)-HETE ausgeschieden werden. Auffallend ist jedoch, dass der höchste Messwert von 12(S)-HETE auch einem der höchsten Resistance-Indices zugeordnet wird. Insgesamt lassen sich aus dieser Untersuchung keine eindeutigen Schlüsse ziehen, eine signifikante Korrelation konnte nicht gezeigt werden. Die positive signifikante Korrelation mit Serumkreatinin passt zu der Beobachtung einer erhöhten 12(S)-HETE-Ausscheidung bei Patienten mit diabetischer Nephropathie (Antonipillai 1996).

4.2.2 15(S)-HETE

Den Produkten der 15-Lipoxygenase, zu denen auch 15(S)-HETE gehört, wird ein antiinflammatorischer Effekt zugeschrieben (Serhan 2003). Schon früher konnte gezeigt werden, dass 15(S)-HETE die proinflammatorischen Effekte von Leukotrien B₄ antagonisiert und zugleich die glomeruläre Synthese von Leukotrien B₄ hemmt (Fischer 1992). Zusammen mit der nachgewiesenen starken Expression der 15-Lipoxygenase im Sammelrohr der Niere (Reinhold 2006) stellte sich die Frage einer verminderten Ausscheidung im Urin bei einer Abstoßung. Der sichtbare, jedoch nicht signifikante Abfall der 15(S)-HETE-Konzentrationen während einer Abstoßungsreaktion (siehe Abb. 3.2.1, 3.2.2 u. 3.2.3) passt zu der Annahme eines entzündungshemmenden, protektiven Effektes von 15(S)-HETE (Serhan 2003). Dies lässt die Hypothese zu, dass bei geringen Konzentrationen ein möglicher Schutz vor Abstoßung durch 15(S)-HETE fehlt. Im Gegensatz dazu sticht wie schon bei 12(S)-HETE (siehe 4.2.1) Probe Nr. 70 (klinisch schwieriger Verlauf, Abstoßung Banff IIa) mit einem besonders hohen Wert bei Abstoßung hervor. Bei Probe Nr. 43 lag ebenfalls eine mit Banff IIa klassifizierte Abstoßung vor. Auch die große Streubreite der Kontrollgruppen-Messwerte bei insgesamt eher niedrigen Konzentrationen passt nicht zu der oben genannten Vermutung. Eine erhöhte Ausscheidung von 15(S)-HETE als Gegenspieler zu Entzündungsmediatoren (Fischer 1992) bei einer Aktivierung des Immunsystems stellt eine weitere mögliche Interpretation der gefundenen Ergebnisse dar. Ein Zusammenhang zwischen der 15(S)-HETE-Ausscheidung und einer immunsuppressiven Medikation wurde bislang nicht untersucht. Möglicherweise könnten Immunsuppressiva jedoch einen Einfluss auf die antiinflammatorische Wirkung von 15-HETE besitzen. Das Verhalten der Werte vor und während Abstoßung im Verlauf (Abb. 3.2.2) kann trotz eines fehlenden statistischen Zusammenhangs als interessante Beobachtung gewertet werden. Hier könnten weitere Untersuchungen mit größeren Probenzahlen weitere Erkenntnisse liefern.

Eine signifikante Korrelation besteht zwischen 15(S)-HETE-Urinkonzentrationen und Serumkreatininwerten (Tab. 3.2.3). Für die Ausscheidung von 15(S)-HETE gibt es in der Fachliteratur bisher keine Hinweise für eine Korrelation mit Retentionswerten im Serum, so dass dieser Zusammenhang hier erstmals gezeigt werden konnte. Bei Diabetikern mit Nephropathie wurde hingegen eine erhöhte Konzentration von 12(S)-HETE im Urin gefunden (Antonipillai 1996). Im Tierversuch zeigte sich bei Cyclosporin-A-induzierter Nephrotoxizität eine erhöhte Ausscheidung von 20-HETE im Urin (Seki 2005).

4.2.3 Leukotrien B₄

Erhöhte Urinkonzentrationen von Leukotrien B₄ konnten bisher bei einigen Erbkrankheiten nachgewiesen werden. Sowohl beim Zellweger-Syndrom (Peroxisomen-Defizienz) (Mayatepek, Flock 1999) als auch beim Sjögren-Larssen-Syndrom (Gendefekt der Fattaldehyddehydrogenase) (Willemsen 2001) ist der Leukotrien-B₄-Stoffwechsel gestört und Leukotrien B₄ sammelt sich an, was schließlich zu einer erhöhten Ausscheidung führt. Außerdem konnte im Tierversuch eine deutlich erhöhte Produktion von Leukotrien B₄ in abgestoßenen Nierentransplantaten festgestellt werden (Spurney 1994). Somit wäre am ehesten eine erhöhte Ausscheidung von Leukotrien B₄ bei Abstoßung zu erwarten. Eine signifikant erhöhte Ausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in unserer Untersuchung lediglich in der Gruppe B nach erfolgter und therapierter Abstoßung. Hier wäre auch ein Zusammenhang mit der Abstoßungstherapie denkbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ergebnisse von Spurney et al. nicht direkt auf die Ausscheidung von Leukotrien B₄ bei der Abstoßung menschlicher Nieren übertragbar sind. Interessante Nebenfunde könnten jedoch die beiden hohen Messwerte in den Abstoßungsgruppen darstellen. Einzig auffälliger klinischer Parameter ist beim Patienten von Probe Nr. 37 eine etwas erhöhte Leukozytenzahl (12,1/nl). Für den stark erhöhten Wert von Probe Nr. 78 ist eine sinnvolle Erklärung nicht zu finden. Eine Kontrolle konnte aufgrund nicht ausreichenden Probenmaterials nicht durchgeführt werden. Die Messwerte der gleichen Patienten zu anderen Zeitpunkten liegen nicht auf diesem hohen Niveau, daher dürfte eine chronische Erkrankung als möglicher Grund für diese Messwerte ausscheiden.

Ein eindeutiger Zusammenhang besteht allerdings zwischen der Urinkonzentration von Leukotrien B₄ und der Körpertemperatur (Abb. 3.3.2). So ist bei höheren Temperaturen auch eine entsprechend höhere Urinkonzentration von Leukotrien B₄ gemessen worden. Für diesen Zusammenhang besteht eine hoch signifikante Korrelation nach Pearson (Tab. 3.3.2). Dieses Ergebnis passt auch zur Beobachtung, dass im Tierversuch bei der

Injektion von Leukotrien B₄ eine Erhöhung der Körpertemperatur festgestellt werden konnte (Mashburn 1986). Leukotrien B₄ scheint demnach als Entzündungsmediator mitverantwortlich für eine Temperaturerhöhung zu sein. Wir konnten nun zeigen, dass umgekehrt bei hohen Temperaturen vermehrt Leukotrien B₄ mit dem Urin ausgeschieden wird.

4.2.4 Leukotrien E₄

Leukotrien E₄ dürfte das populärste im Urin gemessene Eicosanoid sein. Außer der bereits erwähnten Konzentrationserhöhung bei Patienten mit Asthma (Asano 1995) wurden z. B. auch bei Vaskulitiden (Higashi 2004) sowie kürzlich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Stanke-Labesque 2008) erhöhte Urinkonzentrationen von Leukotrien E₄ gemessen. Unseren Ergebnissen zufolge (siehe Abb. 3.4.1) kann ein Zusammenhang zwischen Leukotrien E₄ und Transplantatabstoßung nicht hergestellt werden. Bezüglich einer Abstoßungsreaktion scheint Leukotrien E₄ somit ein unspezifischer Parameter zu sein.

Auffallend ist jedoch die Tatsache, dass die Spitzenwerte in allen Gruppen (Nr. 17, 18, 81 sowie die restlichen nicht bezifferten Maximalwerte) von Patienten stammen, die mit Cyclosporin A immunsuppressiv behandelt wurden. Im direkten Vergleich zeigt sich eine hochsignifikant erhöhte Ausscheidung von Leukotrien E₄ bei Patienten mit Cyclosporin A im Vergleich zu Patienten, die mit Tacrolimus und Mycophenolatmofetil behandelt wurden (siehe Abb. 3.4.2). Diese Beobachtung passt zu bereits nachgewiesenen erhöhten Urinkonzentrationen von Leukotrien E₄ bei Cyclosporin-A-bedingter Nephrotoxizität im Tierversuch (Butterly 2000). Somit lässt sich festhalten, dass die immunsuppressive Behandlung mit Cyclosporin A auch zu einer erhöhten Leukotrien-E₄-Ausscheidung bei Transplantationspatienten führt. Eine Korrelation der Leukotrien-E₄-Konzentrationen mit Entzündungsparametern wie Leukozytenzahl oder CRP (Stanke-Labesque 2008) wäre zu erwarten gewesen, konnte jedoch bei unserer Untersuchung nicht festgestellt werden.

4.2.5 Prostaglandin E Metaboliten

Bereits vor über 25 Jahren wurde eine erhöhte Ausscheidung von Prostaglandin E₂ bei chronischen Nierenerkrankungen nachgewiesen (Suzuki 1980). Später wurden weitere renale Funktionen von Prostaglandin E₂ entdeckt. Prostaglandin E₂ stimuliert die Ausschüttung von Renin und hemmt die NaCl-Absorption in der Henle'schen Schleife (Breyer 2000). Prostaglandine entstehen aus Arachidonsäure mit Hilfe der

Cyclooxygenasen. Eine Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) führt unter anderem zu einer verminderten Ausscheidung von Prostaglandin E₂ (Krämer 2004). Des Weiteren wurde immunhistochemisch eine deutlich erhöhte Expression von COX-1 sowie von COX-2 in den Biopsien von akut abgestoßenen Nieren festgestellt (Hoffmann 2006). Die demnach zu erwartende Erhöhung einer Ausscheidung von Prostaglandin E₂ bei Abstoßung konnten wir durch die Messung der Prostaglandin E Metaboliten zeigen (siehe 3.5). Insbesondere die Werte während einer initialen Abstoßung unterscheiden sich hoch signifikant von denen der Kontrollgruppe. Doch auch vor einer Abstoßung konnten bereits signifikant erhöhte Werte gefunden werden. Somit kann angenommen werden, dass die Messung von Prostaglandin E Metaboliten im Urin einen prädiktiven Wert hinsichtlich der Entwicklung einer Abstoßungsreaktion besitzt. Insbesondere trifft dies für ersten 14 Tage nach Transplantation zu.

Eine frühere Untersuchung zeigte bereits erhöhte Ausscheidungsmengen von Prostaglandin E₂ bei Abstoßung (Ladefoged 1987), hierbei wurden jedoch die Messungen nicht auf die jeweiligen Kreatininkonzentrationen im Urin bezogen. Somit wird in dieser Studie zum ersten Mal eine signifikant höhere Ausscheidung von Prostaglandin E₂ bei Abstoßungspatienten gegenüber Transplantationspatienten ohne Abstoßung - bei zugleich ausgeschlossenenem volumenbedingtem Konzentrationsunterschied - festgestellt.

4.2.6 6-keto Prostaglandin F_{1α}

6-keto Prostaglandin F_{1α} ist der Hauptmetabolit von Prostacyclin (PGI₂), dessen Produktion in der Niere hauptsächlich von der Cyclooxygenase-2 (COX-2) abhängt. PGI₂ führt über eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zur Vasodilatation und hemmt die Thrombozytenaggregation (Bunting 1976). Kürzlich wurde eine anti-apoptotische und zytoprotektive Wirkung von PGI₂ in den Tubuluszellen der Niere festgestellt (Chen 2006). Eine COX-Hemmung bei Endotoxinämie im Tierversuch führte zu einem Abfall der 6-keto Prostaglandin F_{1α}-Konzentration im Urin und zugleich zu einer renalen Funktionsstörung (Wang 2007). Die Hypothese, dass eine Abstoßung mit niedrigeren Werten von 6-keto Prostaglandin F_{1α} einhergehen könnte, wurde durch unsere Messung nicht bestätigt (siehe 3.6). Die gefundene negative Korrelation der 6-keto Prostaglandin F_{1α}-Konzentrationen mit den Serumspiegeln von Tacrolimus (Abb. 3.6.2) bestätigt die Beobachtung, dass die Behandlung mit Tacrolimus im Tierversuch zu einer verminderten Expression von COX-2 in der Niere führt (Höcherl 2002).

5 Zusammenfassung

Über die Ausscheidung von durch Lipoxygenasen gebildeten Arachidonsäurederivaten (Leukotriene, HETEs) bei Abstoßungsreaktion nach humanen Nierentransplantationen existieren bisher keine Veröffentlichungen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Urinausscheidung von 12(S)-HETE, 15(S)-HETE, Leukotrien B₄, Leukotrien E₄ sowie von Prostaglandin-E₂ und 6-keto Prostaglandin F_{1α} bei Patienten mit einer Abstoßungsreaktion ermittelt und mit den Werten einer Kontrollgruppe ohne Abstoßung verglichen. Es erfolgte außerdem eine Zuordnung der Messwerte zu klinischen Parametern, Laborwerten und immunsuppressiver Medikation.

Unseren Ergebnissen zufolge lässt sich festhalten, dass die Höhe der Ausscheidung von 12(S)-HETE, Leukotrien B₄ sowie Leukotrien E₄ im Urin nicht im Zusammenhang mit einer Abstoßungsreaktion stehen dürfte. Eine vermutete Beziehung zwischen 12(S)-HETE-Ausscheidung und Blutdruckwerten oder renalen Resistance-Indices konnte in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden. Interessante Befunde waren jedoch eine positive Korrelation der Leukotrien B₄-Konzentration mit der Körpertemperatur sowie deutlich erhöhte Werte von Leukotrien E₄ bei Patienten die mit Cyclosporin behandelt wurden.

Die Messungen von 15(S)-HETE zeigten unserer Hypothese entsprechend einen Trend zu niedrigeren Werten bei Abstoßung, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis sollte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Auffallend war eine signifikante Korrelation der Messwerte mit Serumkreatininwerten.

Für die Messung von Prostanoiden im Urin im Zusammenhang mit einer Abstoßung nach Nierentransplantation gibt es in der Literatur nur wenige, bereits länger zurückliegende Belege. So wurde Thromboxan B₂ als früher Indikator einer renalen Abstoßung diskutiert (Foegh 1981, Steinhauer 1985), eine regelmäßige Kontrolle dieses Wertes nach Transplantation hat jedoch keine klinische Relevanz erlangen können.

Die Urinkonzentration von 6-keto Prostaglandin F_{1α} scheint unserer Untersuchung nach unabhängig von einer Transplantatabstoßung zu sein. Auffällig war bei der Messung dieses Wertes jedoch eine negative Korrelation mit den Serumspiegeln von Tacrolimus.

Die Beobachtung einer erhöhten Prostaglandin-E₂-Urinkonzentration bei Abstoßung (Ladefoged 1987) hatte bisher keine Konsequenzen für die Nachsorge von nierentransplantierten Patienten. Nun konnte die Untersuchung von Ladefoged mit neueren Methoden bestätigt werden und darüber hinaus eine hoch signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Besonders interessant ist hierbei die Tatsache, dass die signifikanten Unterschiede innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation auftraten. Aus diesem Grund könnte die Messung von Prostaglandin E Metaboliten eine wertvolle Ergänzung zu den heute üblichen Maßnahmen zur Frühdiagnostik einer Abstoßung bei Nierentransplantierten darstellen. Eine prospektive Untersuchung, die z. B. auch die Werte vor Transplantation erfasst, könnte hierüber weitere Informationen liefern.

Allison AC, Eugui EM: Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection. *Transplantation* 80(2S) (2005) 181-190

Antoine C, Lellouche JP, Maclouf J, Pradelles P: Development of enzyme immunoassays for leukotrienes using acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1075 (1991) 162-168

Antonipillai I, Nadler J, Jost Vu E, Bughi S, Natarajan R, Horton R: A 12-Lipoxygenase Product, 12-Hydroxyeicosatetraenoic Acid, Is Increased in Diabetics with Incipient and Early Renal Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(5) (1996) 1940-1945

Asano K, Lilly CM, O'Donnell WJ, Israel E, Fischer A, Ransil BJ, Drazen JM: Diurnal variation of urinary leukotriene E4 and histamine excretion in normal subjects and patients with mild-to-moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* (1995) 643-651

Barry JM, Murray JE: First human renal transplants. *J Urol* 176(3) (2006) 888-890

van Besouw NM, Zuijderwijk JM, Vaessen LM, Balk AH, Maat AP, van der Meide PH, Weimar W: The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clin Exp Immunol*. 141(3) (2005) 534-540

Breyer MD, Breyer RM: Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 (2000) F12–F23

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR: Arterial Walls Generate from Prostaglandin Endoperoxides a Substance (Prostaglandin X) which Relaxes Strips of Mesenteric and Coeliac Arteries and Inhibits Platelet Aggregation. *Prostaglandins* 12(6) (1976) 897-913

Butterly DW, Spurney RF, Ruiz P, Griffiths R, Albrightson C, Coffman TM: A role for leukotrienes in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 57(6) (2000) 2586-2593

Canadian Institute for Health Information: 2008 Annual Report - Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 1997 to 2006 (Ottawa, Ont.: CIHI, 2008).

Chen CH, Lin H, Hsu YH, Sue YM, Cheng TH, Chan P, Chen TH: The protective effect of prostacyclin on adriamycin-induced apoptosis in rat renal tubular cells. *European Journal of Pharmacology* 529 (2006) 8 – 15

Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, Moon IS, Kim SY, Koh YB, Bang BK, Yang CW: Clinical Significance of an Early Protocol Biopsy in Living-Donor Renal Transplantation: Ten-Year Experience at a Single Center. *Am J Transpl.* 5 (2005), 1354-1360

Dupont PJ, Dooldeniya M, Cook T, Warrens AN: Role of duplex Doppler sonography in diagnosis of acute allograft dysfunction - time to stop measuring the resistive index? *Transpl Int* 16 (2003) 648-652

Fischer DB, Christman JW, Badr KF: Fifteen-S-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-S-HETE) specifically antagonizes the chemotactic action and glomerular synthesis of leukotriene B₄ in the rat. *Kidney International* 41 (1992) 1155-1160

Foegh ML, Winchester JF, Zmudka M, Helfrich GB, Cooley C, Ramwell PW, Schreiner GE: Urine i-TXB₂ In Renal Allograft Rejection. *The Lancet* August 29 (1981) 431-434

Gonzalez-Nunez D, Claria J, Rivera F, Poch E: Increased Levels of 12(S)-HETE in Patients With Essential Hypertension. *Hypertension* 37 (2001) 334-338

Goulet JL, Griffiths RC, Ruiz P, Mannon RB, Flannery P, Platt JL, Koller BH, Coffman TM: Deficiency of 5-lipoxygenase accelerates renal allograft rejection in mice. *J Immunol* 167(11) (2001) 6631-6636

Higashi N, Mita H, Taniguchi M, Turikisawa N, Higashi A, Ozawa Y, Tohma S, Arimura K, Akiyama K: Urinary eicosanoid and tyrosine derivative concentrations in patients with vasculitides. *J Allergy Clin Immunol.* 114(6) (2004) 1353-1358

Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, Kurtz A: Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. J Am Soc Nephrol. 13(10) (2002) 2427-2436

Hoffmann U, Banas B, Krüger B, Pietrzyk M, Obed A, Segerer S, Kammerl M, Rümmele P, Riegger GA, Krämer BK: Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human renal allograft rejection-- a prospective study. Transpl Int. 19(3) (2006) 203-212

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (2002) 560-566

Jindal JM, Ryan JJ, Sajjad I, Murthy MH, Baines LS: Kidney Transplantation and Gender Disparity. Am J Nephrol 25 (2005) 474-483

Kälble T, Lucan M, Nicita G, Sells R, Burgos Revilla FJ, Wiesel M: Eau Guidelines on Renal Transplantation. European Urology 47 (2005) 156-166

Krämer BK, Kammerl MC, Kömhoff M: Renal Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Kidney Blood Press Res 27 (2004) 43–46

Kumlin M , Stensvad F , Larsson L , Dahlen B , Dahlen SE: Validation and application of a new simple strategy for measurements of urinary leukotriene E4 in humans. Clin Exp Allergy. 25(5) (1995) 467-479

Ladefoged J: Urinary Prostaglandin E2 Excretion In Renal Allotransplantation In Man. Prostaglandins 34(4) (1987) 611-618

Lechler RI, Batchelor JR: Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med 155 (1982) 31-41

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer Verlag (2007) 1106-1109 [1]

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer Verlag (2007) 420-425 [2]

Mangino MJ, Anderson CB, Deschryver K, Turk J: Arachidonate Lipoxygenase Products And Renal Allograft Rejection In Dogs. Transplantation 44(6) (1987) 805-808

Marks R, Finke J: Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. Springer Semin Immun 27 (2006) 457-476

Mashburn TA Jr, Llanos J, Ahokas RA, Blatteis CM: Thermal and acute-phase protein responses of guinea pigs to intrapreoptic injections of leukotrienes. Brain Res. 376(2) (1986) 285-291

Mayatepek E, Flock B: Increased urinary excretion of LTB₄ and omega-carboxy-LTB₄ in patients with Zellweger syndrome. Clin Chim Acta 282(1-2) (1999) 151-155

Mayatepek E, Lehmann WD: 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid are excreted in the urine of peroxisome-deficient patients: evidence for peroxisomal metabolism in vivo. Pediatr Res 39(1) (1996) 146-149

Merrill, JP, Murray, JE, Harrison, JH and Guild, WR: Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. J Am Med Assoc 160 (1956) 277-282

Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang AD, Loi P, Mboti F, Donckier V, Vereerstraeten P, Abramowicz D: Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. Transplantation 85(7 Suppl) (2008) 3-9

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy. N Engl J Med 349(24) (2003) 2326-2333

Nijkamp Frans, Parnham Michael: Principles of Immunopharmacology, 2nd Edition. Birkhäuser Verlag, Basel (2005) 441-453

OPTN/SRTR: 2006 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1996-2005. Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems

Pradelles P, Grassi J, Maclouf J: Enzyme Immunoassays of Eicosanoids Using Acetylcholin Esterase as Label: An Alternative to Radioimmunoassay. Anal Chem 57 (1985) 1170-1173

Preda A, Van Dijk LC, Van Oostaijen, Pattynama PMT: Complication rate and diagnostic yield of 515 consecutive ultrasound-guided biopsies of renal allografts and native kidneys using a 14-gauge Biopty gun. Eur Radiol 13 (2003) 527-530

Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al: The Banff 1997 working classification. Kidney International 55 (1999) 713-723

Reinhold SW, Vitzthum H, Filbeck T, Wolf K, Lattas C, Riegger GA, Kurtz A, Krämer BK: Gene expression of 5-, 12- and 15-lipoxygenases and leukotriene receptors along the rat nephron. Am J Physiol Renal Physiol 290(4) (2006) F864-872

van Rood JJ: Tissue Typing And Organ Transplantation, The Lancet June 7 (1969) 1142-46

van Rood JJ, Freudenberg J, van Leeuwen A, Schippers HM, Zweerus R, Terpstra JL: Eurotransplant. Transplant Proc 3(1) (1971) 933-941

Salgado O: Noninvasive Acute Rejection Diagnosis in Kidney Transplantation. Transplantation Proceedings 34 (2002) 2543-2544

Sayegh MH, Carpenter CB: Transplantation 50 Years Later – Progress, Challenges and Promises, NEJM 352(26) (2004) 2761-2766

Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H: Safety and Adequacy of Renal Transplant Biopsy. Am J Transpl 5 (2005) 1992-1996

Segoloni GP, Quaglia M: New immunosuppressive drugs for prevention and treatment of rejection in renal transplant. *J Nephrol* 19(5) (2006) 578-586

Seki T, Ishimoto T, Sakurai T, Yasuda Y, Taniguchi K, Doi M, Sato M, Roman RJ, Miyata N: Increased excretion of urinary 20-HETE in rats with cyclosporine-induced nephrotoxicity. *J Pharmacol Sci* 97(19) (2005) 132-137

Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, Colgan SP, Stahl GL, Merched A, Petasis NA, Chan L, Van Dyke TE: Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 171(12) (2003) 6856-65

Sharma AK, Rustom R, Evans A, Donnoly D, Brown MW, Bakran A, Sells RA, Hammad A: Utility of serial Doppler ultrasound scans for the diagnosis of acute rejection in renal allografts. *Transpl Int* 17 (2004) 138-144

Smith WL: The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 259 (1989) 315-324

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8(4) (2008) 753-60

Spurney RF, Ibrahim S, Butterly D, Klotman PE, Sanfilippo F, Coffman TM: Leukotrienes in Renal Transplant Rejection in Rats. *Journal of Immunology* 152 (1994) 867-876

Stanke-Labesque F, Pofelski J, Moreau-Gaudry A, Bessard G, Bonaz B: Urinary leukotriene E(4) excretion: A biomarker of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 14(6) (2008) 769-774

Steinhauer HB, Wilms H, Schollmeyer P: Thromboxane B2 and beta 2-microglobulin as early indicators of renal allograft rejection. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc* 21 (1985) 1032-1036

Suzuki S, Shapiro R, Mulrow PJ, Tan SY: Urinary Prostaglandin E2 Excretion In Chronic Renal Disease. *Prostaglandins and Medicine* 4 (1980) 377-382

Tiefenthaler M, Riedl-Huter C: Stellenwert der Sonographie in der Nierentransplantation. *Acta Medica Austriaca Heft* 3 (2001) 74-77

Tublin ME, Bude RO, Platt JF: The Resistive Index in Renal Doppler Sonography: Where Do We Stand? *American Journal of Roentgenology* 180 (2003) 885-892

Vella JP, Vos L, Carpenter CB, Sayegh MH: Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation* 64(12) (1997) 1823-1828

Vereerstraeten P, Wissing M, De Pauw L, Abramowicz D, Kinnaert P: Male recipients of kidneys from female donors are at increased risk of graft loss from both rejection and technical failure. *Clin Transplantation* 13 (1999) 181-186

Wang W, Zolty E, Falk S, Summer S, Stearman R, Geraci M, Schrier R. Prostacyclin in endotoxemia-induced acute kidney injury: cyclooxygenase inhibition and renal prostacyclin synthase transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(4) (2007) F1131-6

van Weemen BK, Schuurs AHMW: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Febs Letters* 15(3) (1971) 232-236

Willemsen MA, IJst L, Steijlen PM, Rotteveel JJ, de Jong JG, van Domburg PH, Mayatepek E, Gabreëls FJ, Wanders RJ: Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjögren-Larsson syndrome. *Brain* 124(Pt 7) (2001) 1426-1437

van Woerden HC, Wilkinson J, Heaven M, Merrifield J: The effect of gender, age, and geographical location on the incidence and prevalence of renal replacement therapy in Wales. *BMC Nephrol* (2007) 8:1

Wollenberg K, Waibel B, Pisarski P, Rump LC, Kirste G, Krumme B: Careful clinical monitoring in comparison to sequential Doppler sonography for the detection of acute rejection in the early phase after renal transplantation. Transpl Int 13 [Suppl1] (2000) 45-51

Wolters G, Kuijpers L, Kacaki J, Schuurs A: Solid-phase enzyme-immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. J Clin Path 29 (1976) 873-879

Zöfel, Peter: Statistik für Psychologen im Klartext, 10. Auflage, Pearson Studium, S. 136-142; 154

Abb. 1.1: **Runge MS, Patterson C, McCusick VA:** Principles of molecular medicine, 2nd Edition. Humana Press Inc. (2006) S. 658

Abb. 1.2: **Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H:** Safety and Adequacy of Renal Transplant Biopsy. Am J Transpl 5 (2005) S. 1994

Abb. 1.3: **Segoloni GP, Quaglia M:** New immunosuppressive drugs for prevention and treatment of rejection in renal transplant. J Nephrol 19(5) (2006) S. 579

Abb. 1.4: **Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR:** The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy. N Engl J Med. 349(24) (2003) S. 2332.

Abb. 1.5: **Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, Moon IS, Kim SY, Koh YB, Bang BK, Yang CW:** Clinical Significance of an Early Protocol Biopsy in Living-Donor Renal Transplantation: Ten-Year Experience at a Single Center. Am J Transpl. 5 (2005) S. 1357

Abb. 1.6: **Smith WL:** The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. Biochem. J. 259 (1989) S. 315

Alle übrigen Abbildungen sowie sämtliche Tabellen wurden selbst erstellt.

8 Anhang

8.1 Materialien und Laborgeräte

12(S)-HETE Enzyme Immunoassay Kit (Cat. No. 901-050)	Assay Designs
15(S)-HETE Enzyme Immunoassay Kit (Cat. No. 900-051)	Assay Designs
6-keto Prostaglandin F _{1α} EIA Kit (Cat. No. 515211)	Cayman Chemical
Aceton >99,5% zur Synthese	Roth
Einmalhandschuhe "Peha-soft powderfree"	Hartmann
Essigsäureethylester (Ethylacetat) Rotisolv HPLC	Roth
Glasgefäß "Duran" 50 ml, 100 ml, 500 ml und 1000 ml	Schott
Konisches Röhrchen 15 ml und 50 ml	Falcon
Leukotriene B ₄ EIA Kit (Cat. No. 520111)	Cayman Chemical
Leukotriene E ₄ EIA Kit (Cat. No. 520411)	Cayman Chemical
Mehrfachpipette "Transferpette-8" 20-200 µl	Brand
Natriumchlorid >99,8 %	Roth
Papiertücher "Kitchen Roll Extra Absorbent"	Tork
PC-Software "Excel 2003", "Word 2003"	Microsoft
PC-Software "Softmax"	Molecular Devices
PC-Software "SPSS 15.0"	SPSS Inc.

Pipettiergerät "pipetman" P10, P100, P200 und P1000	Gilson
Pipettierhilfe "pipetus"	Hirschmann
Pipettierhilfe "Multipette plus"	Eppendorf
Pipettenspitze "Combitips plus" 0,5 ml und 5 ml	Eppendorf
Pipettenspitze 200 µl (gelb) und 1000 µl (blau)	Sarstedt
Pipettenspitze "SafeSeal-Tips" 10 µl	Biozym
Plattenlesegerät "E max precision microplate reader"	Molecular Devices
Plattenmischgerät "IKA MTS 2/4 digital"	IKA-Werke
Prostaglandin E Metabolite EIA Kit (Cat. No. 514531)	Cayman Chemical
Reagiergefäß 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
Schiffchen mit Deckel No. 703459	Brand
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt
Standard-Pasteurpipette, ungraduiert	Roth
UltraPure Water	Cayman Chemical
Vakuumzentrifuge "Alpha RVC/Alpha 1-4"	Christ
Vortexer "REAX 2000"	Heidolph
Waage "Sartorius PT1200"	Sartorius
Zentrifuge "Heraeus Biofuge fresco"	Kendro

8.2 Übersichtstabellen

In der folgenden Tabelle sind die p-Werte der verschiedenen Gruppenvergleiche zusammengefasst:

	12HETE	15HETE	LTB ₄	LTE ₄	PGEM	PGF _{1α}
A 14 T - A 3 M	0,482	0,200	0,757	0,354	0,917	0,564
B 14 T - B 3 M	0,674	0,600	0,916	0,345	0,175	0,564
C 14T - C 3M	0,817	0,121	0,221	0,502	0,762	0,564
A 14 T - C 14 T	0,663	0,280	0,247	0,726	0,037*	0,149
B 14 T - C 14 T	0,311	1,000	0,322	0,727	0,005**	0,386
A 3 M - C 3 M	0,501	0,411	0,647	0,850	0,066	1,000
B 3 M - C 3 M	0,385	0,107	0,027*	0,600	0,221	0,773

*Tab. 8.2.1: Übersicht der p-Werte bei den Gruppenvergleichen. Testung auf signifikante Unterschiede mit dem Mann-Whitney-U-Test. Getestet wurden jeweils die Gruppen im zeitlichen Verlauf sowie der Unterschied zwischen den Gruppen zum gleichen Zeitpunkt. A: ohne Abstoßung bei 14 T, mit Abstoßung bei 3 M; B: mit Abstoßung bei 14 T, ohne Abstoßung bei 3 M; C: ohne Abstoßung bei 14 T und 3 M.. *signifikant mit $p < 0,05$ **signifikant mit $p < 0,01$*

Eine weitere Übersicht stellt die Korrelationen der gemessenen Werte mit den jeweils zugehörigen klinischen Parametern und Laborwerten dar:

	12HETE	15HETE	LTB ₄	LTE ₄	PGEM	PGF _{1α}
Körpertemperatur	0,008	-0,110	0,327**	0,020	0,120	0,003
RR systolisch	0,064	0,064	-0,152	0,014	0,055	-0,254
RR diastolisch	0,014	-0,086	-0,169	-0,199	0,055	-0,193
Resistance Index	-0,131	-0,019	0,064	0,072	-0,095	0,229
Leukozytenzahl	-0,173	-0,086	0,064	0,099	0,078	-0,301
CRP	0,005	-0,017	0,057	-0,001	-0,106	-0,211
Serumkreatinin	0,273*	0,255*	0,059	-0,143	0,022	0,028
Tacrolimusspiegel	0,058	-0,005	-0,045	-0,043	-0,140	-0,409

Tab. 8.2.2: Korrelationen nach Pearson zwischen Messwerten und klinischen Parametern.

**zweiseitige signifikante Korrelation mit $p < 0,05$, **zweiseitige signifikante Korrelation mit $p < 0,01$*

8.3 Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich besonders bedanken:

Prof. Dr. B. Krämer - für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der Arbeit.

Prof. Dr. B. Banas - für die freundliche Übernahme des Themas und die Korrektur.

Dr. Stephan Reinhold - für die zeitaufwändige Betreuung meiner Arbeit sowie für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Benjamin Stoelcker - für die Anleitung im Labor und für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Meiner Frau Dorle, meinen Eltern Evi und Alfons, meinen Schwiegereltern Maria und Albert sowie allen Freunden für jegliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Zuletzt möchte ich auch meiner Tochter Mona danken, dass sie sich mit ihrer Ankunft bis zur Fertigstellung dieser Arbeit Zeit gelassen hat.

8.4 Lebenslauf

Geboren 13.08.1981 in Amberg/Oberpfalz

Vater Alfons Scherl, Arzt

Mutter Evi Scherl, Lehrerin

Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

1988-92 Besuch der Grundschule Ammerthal

1992-2001 Besuch des Max-Reger-Gymnasiums in Amberg/Opf.
Abschluss mit Abitur im Juni 2001

2001/02 Zivildienst in der Werkstatt für Behinderte der Lebenshilfe Amberg

2002-2008 Studium der Medizin an der Universität Regensburg

2004 Physikum

2007/08 Praktisches Jahr

2008 2. ärztliche Prüfung, Abschluss des Studiums

seit 2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin im Krankenhaus
Burglengenfeld (Chefarzt Dr. F. J. Riedhammer)

Famulaturen:

02/2005 Asklepios-Klinikum Bad Abbach (Orthopädie, 4 Wochen)

08/2005 Praxis Dr. Alfons Scherl in Amberg (Chirurgie, 3 Wochen)

04/2006 Klinikum der Universität Regensburg (Innere Medizin, 2 Wochen)

08/2006 Bezirksklinikum Regensburg (Psychiatrie, 2 Wochen)

09/2006 Praxis Dr. Alfons Scherl in Amberg (Chirurgie, 2 Wochen)

02/2007 Zomba Central Hospital, Malawi (Gynäkologie, 4 Wochen)

Praktisches Jahr:

09/2007 Klinikum St. Marien Amberg (Innere Medizin, 1. Tertial)

12/2007 Bezirksklinikum Regensburg (Psychiatrie, 2. Tertial)

04/2008 Klinikum der Universität Regensburg (Chirurgie, 3. Tertial)