

Dissertation

Albumin dysfunction in chronic liver disease

submitted by

**Dr. med. univ.
Walter Spindelböck**

for the Academic Degree of
**Doctor of Medical Science
(Dr. scient. med.)**

at the
Medical University of Graz

**Department of Internal Medicine
Division of Gastroenterology and Hepatology**

under the Supervision of
Univ. Prof. Dr. Rudolf E Stauber
and
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner
and
ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Karl Öttl

2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und abgefasst, und jene Personen und Institutionen, die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt habe. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikationen wurde gemäß den Regeln der „Good Scientific Practice“ durchgeführt.

Graz, am 21. August 2015

Danksagungen

Ich möchte an dieser Stelle einigen Personen danken, die zum Entstehen dieser Dissertation direkt oder indirekt beigetragen haben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Erstens gilt meiner Schwester, Frau Dr. Ute Kronegger, deren Hingabe für die Medizin auch mich bereits während meiner Schulzeit für dieses Studium begeisterte, Dank. Ich hätte ohne sie nicht den ärztlichen Beruf gewählt und somit wurde von ihr der Grundstein dieser Dissertation gelegt. Zudem möchte ich meinen Eltern, Mag. Dr. Maria und Mag. Dr. Klaus Spindelböck danken, die mir das Studium der Medizin ermöglicht und mich auf dem bisherigen Weg unermüdlich unterstützt haben.

Zweitens danke ich hier sehr herzlich dem „Vater“ meiner Diplomarbeit, Herrn Univ. Prof. Dr. Johann Deutsch, der mich am Ende meines Studiums für die (pädiatrische) Hepatologie begeisterte und meinen Betreuern, Univ. Prof. Dr. Rudolf Stauber, Assoz. Prof. Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner und ao Univ. Prof. Dr. Karl Öttl für ihre Mühen und Bemühungen für und rund um diese Dissertation. Insbesondere gilt mein Dank hier Herrn Univ. Prof. Dr. Rudolf Stauber, der großen Anteil an meiner Wahl der Inneren Medizin und speziell der Gastroenterologie und Hepatologie als Spezialfach hatte und mir die ersten drei Jahre meines Arbeitslebens durch die Anstellung als Drittmittelassistent an der Grazer Universitätsklinik ermöglichte.

Ferner gilt einigen weiteren Personen Dank, ohne die diese Dissertation ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Das medizinisch-technische Personal des Institutes für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz, insbesondere Frau Doris Payerl und Frau Martina Brtnik waren in technischen Fragen rund um die Albuminmessungen stets hilfsbereit und zeichnen auch für einen Teil der den Berechnungen zugrunde liegenden Daten verantwortlich. Ebenso danke ich dem Personal des Labors von Frau Assoz. Prof. Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner für die Bereitstellung der Rohdaten der Messungen zur Neutrophilenfunktion.

Abschließend sei noch meiner Partnerin, Frau Bakk. Sandra Lemesch, MSc gedankt, welche die Entstehung dieser Arbeit, welche zum Großteil in meiner Freizeit stattfand, jederzeit unterstützte und viel Verständnis für die so entgangene gemeinsame Zeit aufbrachte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1 Einleitung	13
1.1 Albumin allgemein	13
1.2 Redox Eigenschaften des Albuminmoleküls	15
1.2.1 Allgemein	15
1.2.2 Physiologische Veränderung der Albuminfraktionen	19
1.3 Albuminzusammensetzung bei verschiedenen Krankheitsbildern	21
1.3.1 Albuminfraktionen bei nicht-hepatischen Erkrankungen	21
1.3.2 Albuminfraktionen bei Lebererkrankung	22
1.3.3 Albuminfraktionen bei kommerziell erhältlichem humanem Serumalbumin	26
1.4 Relevanz der Albuminoxidation und physiologische Implikationen bei Lebererkrankung	26
1.5 Ziele der Dissertation	30
2 Methoden	31
2.1 Patienten.....	31
2.2 Messungen und Analysen	32
2.2.1 Allgemein	32
2.2.2 Albuminfraktionen.....	33
2.2.3 Funktion neutrophiler Granulozyten.....	35
2.2.4 Hepatitis C.....	36
2.2.5 Statistische Auswertungen	37
3 Ergebnisse	39
3.1 Untersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose	39
3.1.1 Albuminfraktionen bei Patienten mit akuter Dekompensation einer Leberzirrhose (Kohorte Graz)	39
3.1.2 Albuminfraktionen bei Patienten mit akuter Dekompensation einer Leberzirrhose (multinationale Kohorte).....	44
3.1.3 Vergleich der Albuminfraktionen aus gemischt venösem und Lebervenenblut.....	53
3.2 Methodenvergleich der Höhen- und Flächenmessung der Albuminfraktionen ..	57
3.2.1 Gesamtdaten	57
3.2.2 Patienten mit Leberzirrhose, n=406.....	60
3.2.3 Patienten ohne Leberzirrhose, n=136	63
3.2.4 Zusammenfassung der Auswertemethoden	66
3.3 Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C	67
3.3.1 Albuminfraktionen bei Patienten mit Chronischer Hepatitis C.....	68

3.3.2	Neutrophilenfunktion bei Patienten mit Chronischer Hepatitis C.....	69
4	Diskussion	75
5	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

ACLF	Acute – on – chronic liver failure
ALD	alcoholic liver disease
ANOVA	analysis of variance
AUROC	area under the ROC
CANONIC	CLIF Acute – On – Chronic Liver Failure Study
CHC	chronische Hepatitis C
CHC-mZ	CHC mit Leberzirrhose
CHC-oZ	CHC ohne Leberzirrhose
CI	Konfidenzintervall
CLIF	Chronic liver failure – Konsortium
CPS	Child Pugh Score
Da	Dalton
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FMLP	N-formyl-MetLeuPhe
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hepatische Encephalopathie
HMA	humanes Mercaptalbumin
HNA1	humanes Nonmercaptalbumin 1
HNA2	humanes Nonmercaptalbumin 2
HPLC	high performance / pressure liquid chromatography
HSA	humanes Serumalbumin
kDa	Kilodalton
HNA1	humanes Nonmercaptalbumin 1
LV	Lebervene
LZ	Leberzirrhose
MARS	Molecular Adsorbents Recirculating System
MELD	model of end – stage liver disease
NAFLD	non – alcoholic fatty liver disease

NASH	Nicht – alkoholische Steatohepatitis
NIDDM	nicht – insulinpflichtiger Diabetes mellitus
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ROC	receiver operating characteristic
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
VCS	Vena cava superior

Zusammenfassung

Hintergrund

Die oxidative Veränderung der Aminosäure Cystein-34 am menschlichen Albuminmolekül resultiert in der Bildung reversibel und irreversibel oxidierten Albuminfraktionen. Diese Veränderungen und damit die Mengen an oxidativ verändertem Albumin sind bei Patienten mit Leberzirrhose ausgeprägter als bei anderen, ebenfalls mit oxidativem Stress assoziierten, Erkrankungen. Zudem wird aus bisherigen Arbeiten die Menge des irreversibel oxidierten Albumins als Prognoseparameter bei Patienten mit Leberzirrhose vermutet.

Ziele dieser Dissertation sind die weitere Charakterisierung der oxidativ veränderten Albuminfraktionen bei Patienten mit Leberzirrhose und / oder chronischer Hepatitis C, die Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges der Albumindysfunktion zur Dysfunktion neutrophiler Granulozyten bei chronischer Hepatitis C sowie die Klärung methodischer Fragestellungen der Albuminbestimmung.

Material und Methoden

Es wurden Patienten mit akut dekompensierter Leberzirrhose im Rahmen der Studie „CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study“ an der Universitätsklinik für Innere Medizin rekrutiert sowie Patienten einer multinationalen Kohorte zur Berechnung der prognostischen Wertigkeit der Albuminfraktionen herangezogen. Darüber hinaus wurden Patienten, bei welchen eine Lebervenenkatheter – Untersuchung durchgeführt wurde und Patienten mit chronischer Hepatitis C mit und ohne Leberzirrhose rekrutiert.

Ergebnisse

Es konnte erstmals das Vorliegen großer Mengen oxidativ veränderten Albumins sowie die prognostische Wertigkeit des irreversibel oxidierten Albumins hinsichtlich des Patientenüberlebens an einer großen multinationalen Kohorte akut dekompensierter Patienten mit Leberzirrhose (n=333) als gleichwertig im Vergleich zum MELD – Score bestätigt werden.

Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigten sich diskretere Veränderungen der

Albuminoxidation, welche nicht durch eine Dysfunktion neutrophiler Granulozyten erklärt werden konnten.

Es gelang zu zeigen, dass der Entnahmeort der Blutprobe (peripher vs. zentral) keinen Einfluss auf die Bestimmung der Albuminfraktionen hat; zudem gelang die Bestätigung der Bestimmung der Albuminmengen mittels peak-Höhenmessung als signifikant unterschiedlich zur peak-Flächenmessung, welche als Methode der Wahl hinkünftig eingesetzt werden sollte.

Schlussfolgerung

Die für diese Dissertation formulierten methodischen und inhaltlichen Fragestellungen konnten mit repräsentativen Patientenzahlen beschrieben und beantwortet werden. Insbesondere irreversibel oxidiertes Albumin ist als Biomarker für das Patientenüberleben bei dekompensierter Leberzirrhose valide, scheint ohne eine präanalytische Standardisierung jedoch nicht universell einsetzbar. Wichtige methodische Fragestellungen konnten ebenfalls geklärt werden.

Abstract

Background

Oxidative damage at Cystein-34 of the human serum albumin leads to the formation of reversibly and irreversibly oxidated albumin fractions. These changes and the amount of oxidatively modified albumin are more pronounced in patients with liver cirrhosis than in patients with other diseases that are known to exert oxidative stress. There is thought to exist a prognostic value of irreversibly modified albumin in patients with liver cirrhosis. The aims of this thesis are therefore to further characterize the oxidative modifications of albumin in patients with liver cirrhosis and / or chronic hepatitis C, the clarification of a possible link of this albumin dysfunction to a dysfunction of neutrophils in hepatitis C and the clarification of methodological aspects regarding albumin measurement.

Material and methods

Patients with acutely decompensated liver cirrhosis were recruited both in Graz and throughout Europe (n=333, „CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study“) to study albumin fractions in liver cirrhosis and evaluate their prognostic value.

Moreover, patients undergoing hepatic venous pressure measurement and patients with chronic hepatitis C (with and without liver cirrhosis) were recruited.

Results

The presence of large amounts of oxidatively modified albumin could be described in a large cohort of patients with acutely decompensated liver cirrhosis (n=333) for the first time, the prognostic value regarding patient survival could be demonstrated to be comparable to the MELD – score.

More discrete changes could be shown in patients with chronic hepatitis C, a possible link to neutrophil dysfunctions was not evident.

It could be shown that the results of the albumin measurements are irrespective of a peripheral or central point of blood aspiration. Furthermore, the peak – height method could be demonstrated to be significantly different to the peak – area method in the

quantification of albumin measurements, the latter of which should be used in future studies.

Conclusion

The hypotheses formulated for this thesis could be answered by investigation of representative patient numbers. Especially, irreversibly oxidized albumin is valid as a biomarker regarding survival in patients with decompensated liver cirrhosis, but its universal use may be hampered by the need of preanalytical standardization. Relevant methodological questions could also be answered in this thesis.

1 Einleitung

1.1 Albumin allgemein

Albumin (von lateinisch *albumen* = Weißes) übernimmt als häufigstes Plasmaprotein (Konzentration etwa 4-5 g/l) mehrere zentrale Rollen im menschlichen Organismus: Einerseits wird durch die Gesamtheit der Plasmaproteine (und damit in großem Maße durch Albumin, welches alleine rund 60-70% der Protein-Gesamtmenge repräsentiert ¹) die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blut zu großen Teilen gewährleistet. Vom gesamten kolloidosmotischen Druck im Plasma von rund 28 mmHg werden Albumin rund 80%, also rund 22 mmHg zugeschrieben. ² Albumin ist zudem am Transport unterschiedlicher proteingebundener und nicht wasserlöslicher Substanzen beteiligt. Hierzu zählen in erster Linie Fettsäuren, nicht wasserlösliche Hormone, Bilirubin, Zink und eine Vielzahl von Medikamenten. ^{3,4} Ebenfalls ist die durch Albumin vermittelte Pufferkapazität physiologisch relevant, wenngleich kleiner als jene anderer Puffersysteme des menschlichen Organismus (beispielsweise der des Hydrogencarbonat – Puffers). Mit einer Molekülgröße von 66000 Dalton (Da) oder 66 kDa ist Albumin im Vergleich zu den alpha-, beta- und gamma-Globulinen (90 – 120 kDa), welche in einer Gesamtmenge von etwa 3-4 g/l vorkommen, ein relativ kleines Plasmaprotein. Das zirkulierende Albuminmolekül besteht aus lediglich 585 Aminosäuren, obwohl 609 Aminosäuren codiert sind. Die ersten 24 Aminosäuren haben jedoch Signal- und Propeptidfunktionen und werden posttranslational entfernt, womit 585 Aminosäuren verbleiben. ⁵

Schwere Erkrankungen gehen aus verschiedenen Gründen mit erniedrigten Albuminspiegeln (Hypalbuminämie) einher. Häufige Ursachen für Hypalbuminämie sind Synthesestörungen bei Unterernährung oder Leberinsuffizienz (in erster Linie bei Leberzirrhose oder akutem und chronischem Leberversagen), Verluste zirkulierenden Albumins über Niere (nephrotisches Syndrom) oder Darm (Proteinverlust – Enteropathie) sowie Zustände chronischer oder massiver Entzündung (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS). ⁶ Hierbei scheint Albumin als „negatives“ Akut – Phase Protein bei Entzündung einer negativen Rückkoppelung zu unterliegen. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen kann das Bestreben des Organismus bei Entzündung gesehen werden,

Aminosäuren aus so genannten „negativen“ Akut – Phase Proteinen einzusparen, um sie für die Synthese der „positiven“ Akut – Phase Proteine zur Verfügung stellen zu können. ⁷

Obwohl Albumin bei verschiedenen Krankheitszuständen vermindert ist, zeigte sich die therapeutische Albumingabe trotz intensiver Forschung bei nur wenigen, ausgesuchten Krankheitsbildern wirksam. Dabei wird die Wichtigkeit des Albumins im Kontext der Leberzirrhose deutlich: Die therapeutische, intravenöse Albumingabe wird aktuell nur bei der spontan bakteriellen Peritonitis (Metaanalyse aus 4 randomisierten Studien in ⁸), bei großvolumigen Parazentesen (Metaanalyse aus 17 randomisierten Studien in ⁹) sowie bei der Therapie des hepatorenen Syndroms in Kombination mit Vasokonstriktoren ^{10,11,12,13} (Indikationen bei Patienten mit Leberzirrhose) sowie zur Volumentherapie bei Sepsis und zur Plasmapherese (Indikationen bei Patienten ohne Leberzirrhose) empfohlen und eingesetzt. ⁶ Eine umfassende Betrachtung der pathophysiologischen Konzepte sowie aktuellen und möglichen therapeutischen Ansätze von Albumin bei Leberzirrhose gibt ein rezenter Übersichtsartikel von Garcia-Martinez et al. ¹⁴

Die Forschung an Albumin (gemessen an publizierten Artikeln in wissenschaftlichen Fachjournalen bei Suche in PubMed mit dem Suchbegriff "Serum Albumin"[Mesh]) erreichte in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts einen relativen Höhepunkt mit knapp 2000 Artikeln im Jahr 1974 (entsprechend 826 / 100.000 publizierter Artikel). In den Folgejahren wurden etwa 1200 Artikel pro Jahr bis zu einem Anstieg über 2000 Artikel pro Jahr ab 2010 publiziert, wobei die relative Anzahl aufgrund der insgesamt steigenden Zahl an Publikationen stagniert bzw. leicht sinkt (2013: 193 / 100.000). ¹⁵

1.2 Redox Eigenschaften des Albuminmoleküls

1.2.1 Allgemein

Es wird davon ausgegangen, dass die Formierung reaktiver Sauerstoffradikale (gemeinhin auch als „oxidativer Stress“ bezeichnet) ein wichtiger Mechanismus ist, der Krankheitsvorgänge auslöst und begleitet.¹⁶ Hierbei ist die Oxidation von Proteinen aufgrund deren ubiquitären Vorkommens ein häufiger Prozess, dem funktionell relevante Eigenschaften (z.B. Funktionsverlust und Abbau des Proteins bei irreversibler Oxidation) zugesprochen werden.¹⁷

Albumin übt im Organismus eine zentrale antioxidative Funktion aus, wobei diese von Molekülen an mehreren Positionen des Albuminmoleküls ausgeht.^{17,18} Die quantitativ wichtigste Rolle spielt hier die einzige freie der insgesamt 35 Cystein-Gruppen des Serumalbumins, jene an der 34. Aminosäureposition vom N-terminalen Ende des Proteins gezählt (Cys-34). Die restlichen 34 Cysteine im Albuminmolekül bilden miteinander 17 Disulfidbrücken innerhalb des Moleküls. Rund 80% der im Blut verfügbaren Thiolgruppen werden vom Cys-34 des Albumins repräsentiert.¹⁹ Diese Eigenschaft wurde experimentell bestätigt, indem bei kritisch kranken Patienten (Intensivstationsaufenthalt aufgrund von Sepsis oder akutem Lungenschaden) durch Infusion von Albumin der Plasma-Thiol-Pool und damit die antioxidative Kapazität rasch und nachhaltig erhöht werden konnte.^{20,21} Zusätzlich zur Redox-Kapazität des Cys-34 kommt dem N-terminalen Ende des Albuminmoleküls eine antioxidative Funktion zu, die sich auf die Bindung von Metallionen (Cobalt und Nickel) bezieht und deren klinische Anwendung sich auf die Detektion von Ischämie (daher auch „ischemia modified albumin“) bezieht.¹⁸ In der vorliegenden Arbeit wird auf die letztgenannte Redox-Modifikation des Albumins nicht näher eingegangen und es werden als „Oxidationsstatus“ des Albumins die Veränderungen am Cys-34 des humanen Serumalbumins (HSA) bezeichnet. Abbildung 1B und 1C zeigen die Lage des N-terminalen Endes (orange) und des Cys-34 (gelb) innerhalb der Tertiärstruktur des humanen Serumalbumins.²²

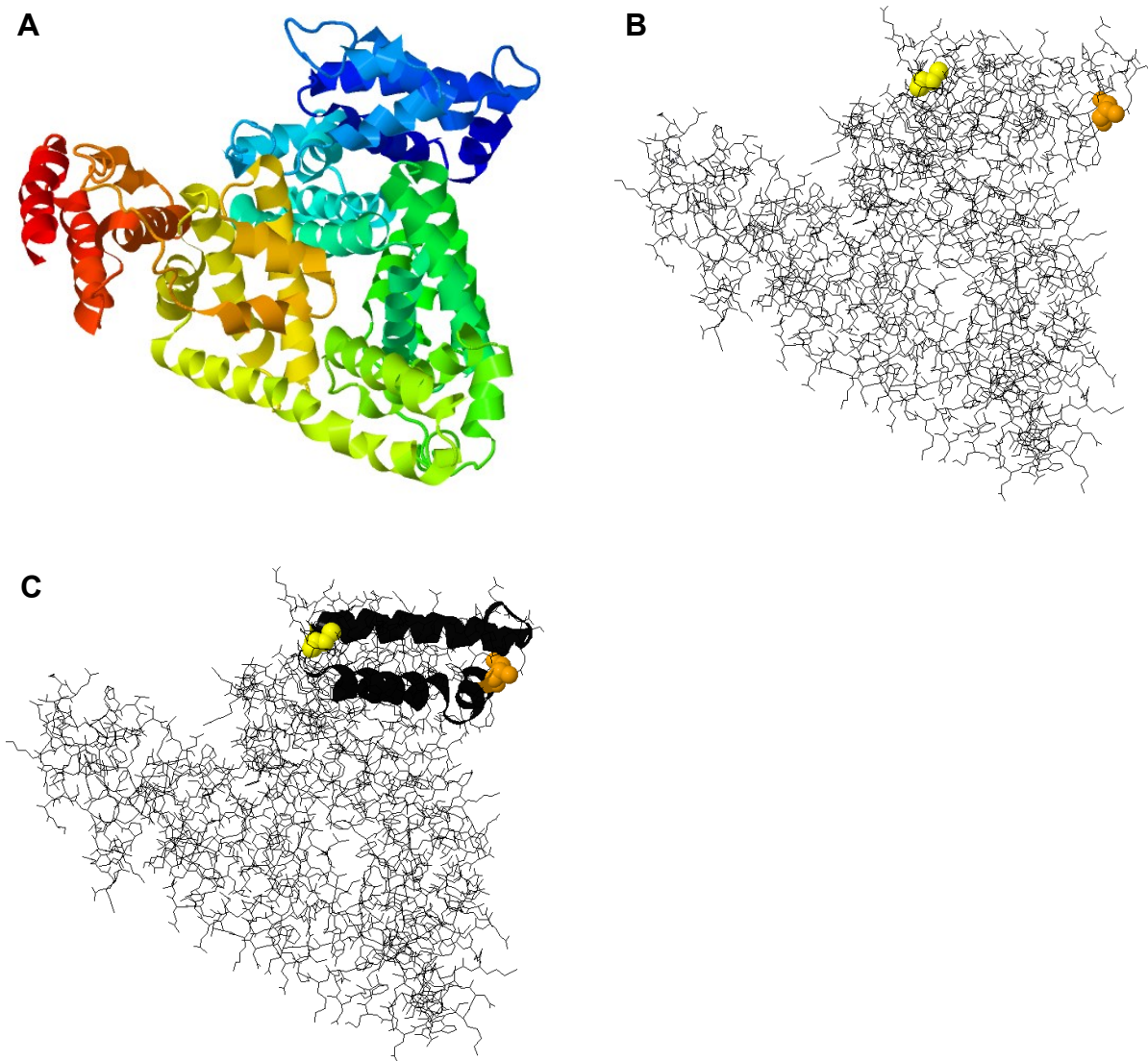


Abbildung 1 ²²

- A: Tertiärstruktur des HSA; die alpha-Helix Strukturen sind zu erkennen und aufeinanderfolgend in Regenbogenfarben eingefärbt
- B: Die Redox-relevanten Positionen (Cys-34 in gelb und N-terminales Ende der Aminosäuresequenz in orange) sind in einem Drahtgeflecht-Modell des HSA dargestellt
- C: Die Lage des Cys-34 zwischen zwischen zwei benachbarten alpha-Helices ist zu erkennen

Bezogen auf den Oxidationsstatus an der Stelle des Cys-34 liegt Albumin im menschlichen Blut in unterschiedlichen Oxidationsstufen vor:

1. An Cys-34 reduziertes HSA:

Wird aufgrund der Präsenz der Thiolgruppe (Alb-SH) als „Humanes Mercaptalbumin (HMA)“ (mercapt- stellt die Vorsilbe für Thiolverbindungen, auch Mercaptane genannt, dar) bezeichnet. Die Eigenschaft des Mercaptans (*mercurium captans* = Quecksilber fangend) HMA Quecksilberionen zu binden wurde 1947 genutzt es zu kristallisieren und zu isolieren²³ und 1963 um sein Molekulargewicht zu bestimmen. Dieses wurde initial mit 64900 ± 300 Dalton angegeben.²⁴ HMA repräsentiert im gesunden Blut mit etwa 65-80% den Großteil des zirkulierenden HSA.^{25,26}

2. An Cys-34 oxidiertes HSA:

Wirkt oxidativer Stress auf HMA während seiner Zirkulation ein kann die Thiolgruppe an Cys-34 oxidiert werden. Es entsteht durch Oxidation der –SH Gruppe eine Sulfensäure (Alb-S-OH), die als Zwischenschritt zu stabilen Verbindungen gilt.²⁷ In weiterer Folge bilden sich stabile dethiolierte Albuminmoleküle (daher „oxidiertes Albumin“ oder „Humanes Nonmercaptalbumin, HNA“).

- a) Es kann sich an Cys-34 ein Disulfid (Alb-S-S-X) bilden. Dabei bezeichnet X die Präsenz eines kleinmolekularen Thiols (Glutathion [-G], Cystein [-Cys] oder Homocystein [-HCys]), es entstehen gemischte Disulfide dieser Moleküle mit Albumin. Diese Bildung gemischter Disulfide mit der freien –SH Gruppe des Albumin wurde 1966 bei der Untersuchung von bovinem Serumalbumin charakterisiert. Dabei wurde auch das Verhältnis der gebundenen Thiole in der Weise charakterisiert, daß mengenmäßig deutlich mehr Cystein als Glutathion und am wenigsten Homocystein zur Bildung von HNA1 beiträgt.²⁸ Die Disulfidbindung ist reversibel (daher „Reversibel oxidiertes Albumin“). Aufgrund der Position des Peaks des Albumin-Disulfides in der HPLC als erstem der HNA-Peaks wird diese Form des HNA als HNA1 bezeichnet. Es wird davon ausgegangen, dass HMA und HNA1 einem ständigen Fließgleichgewicht unterliegen. Dabei kann HNA1 als Disulfid an Cys-34 mit weiteren zirkulierenden Thiolen (s.o.) zu HMA reduziert und damit wieder thioliert werden, wobei zirkulierende Disulfide (zB Glutathiondisulfid) entstehen.²⁹

1.2.2 Physiologische Veränderung der Albuminfraktionen

Alter:

Der Anteil des HMA am Gesamtalbumin liegt bei gesunden, jungen Personen mit individuellen Unterschieden zwischen 65 und 80%, wobei altersabhängig signifikante Unterschiede im Sinne höherer Anteile an HMA auf Kosten des HNA1 festgestellt werden können. Mittels indirekter Messung über den Gesamtgehalt an –SH Gruppen und das Gesamtalbumin im Blut wurde ein solcher Effekt des Alters bereits 1970 beschrieben.³² Hierbei wurden Messungen bei gesunden männlichen Personen von 20-90 Jahren durchgeführt, welche eine Abnahme des SH-Albumins im Vergleich zum Gesamtalbumin von 68% (20-29a) bis 57% (80-89a) zeigten. Eine hochsignifikante negative Korrelation zum Alter wurde berechnet.

Die alterssynchrone Abnahme des HMA wurde kurz nach der Entwicklung der Auftrennung der Albuminfraktionen mittels HPLC im Jahr 1988 bestätigt. Im Mittel wurden bei 60-90 Jahre alten Männern HMA Werte von 48% des Gesamtalbumins gemessen. Mit steigendem Alter zeigte sich dabei auch innerhalb dieser Gruppe eine Abnahme des HMA (60-69a: $52 \pm 4\%$, 70-79a: $47 \pm 6\%$ und 80-89a: $47 \pm 5\%$).^{26,33,34} Eine Erhöhung des HNA2 korrespondierend zu steigendem Alter ist nicht beschrieben, wengleich aus den zumindest in einer Originalarbeit dargestellten HPLC Diagrammen die Anwesenheit von HNA2 hervorgeht.³⁴

Körperliche Belastung:

Sowohl in einer japanischen als auch in einer österreichischen Studie an gesunden, jungen Männern konnte der Einfluss von körperlicher Belastung auf den Oxidationsstatus des HSA dargestellt werden. Sowohl bei einmaliger starker körperlicher Belastung (zB Ergometerbelastung) als auch bei mehrtägiger Belastung sinkt der Anteil an HMA korrespondierend zum Anstieg von HNA1 nach der Belastung, um sich nach Beendigung der Belastung wieder auf Ausgangswerte zu erholen.^{26,35}

Bemerkenswerterweise ändern sich im Alter und bei körperlicher Belastung in erster Linie die Konzentrationen von HMA und HNA1 (im Sinne des bereits beschriebenen dynamischen Gleichgewichtes). Das höhergradig oxidierte HNA2 ist nach einmaliger

starker Belastung nicht verändert. Bei intensiver, mehrtägiger Belastung steigt zwar numerisch auch HNA2 an, wobei dieser Anstieg als nicht signifikant beschrieben wird.^{26,35} Offenbar bestehen im gesunden Organismus ausreichende Kompensationsmechanismen, die eine Oxidation des HNA über seinen reversibel oxidierten Zustand hinaus zu verhindern imstande sind.

1.3 Albuminzusammensetzung bei verschiedenen Krankheitsbildern

1.3.1 Albuminfraktionen bei nicht-hepatischen Erkrankungen

Die Zusammensetzung der oxidativ modifizierten Albuminfraktionen HNA 1 und 2 im Blut und deren pathophysiologische Bedeutung wurde bei einer Reihe von extrahepatischen Erkrankungen, welche mit erhöhter Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert sind, untersucht. Die Mehrzahl der Publikationen stammt von Forschungsgruppen aus Japan. Neben einer Anzahl von Publikationen bei chronischen Nierenerkrankungen und Hämodialyse^{36,37,38,39,40} wurden ebenso Patienten mit Diabetes mellitus II⁴¹ sowie Patienten unter Allgemeinnarkose⁴² untersucht. Patienten mit Sepsis wurden als Kontrollgruppe für Patienten mit Leberinsuffizienz untersucht.⁴³

Bei Patienten mit Nierenerkrankung, welche noch nicht dialysepflichtig sind, korrelieren HNA1 und HNA2 signifikant mit dem Grad der Nierenfunktionseinschränkung, gemessen an der Höhe des Serumkreatinins und der Kreatininclearance.^{37,38} Bei dialysepflichtigen Patienten wird HNA1 durch Dialyse signifikant zu HMA reduziert.^{36,39,40} Die Höhe des oxidierten Albumins ist bei Dialysepatienten ein Prädiktor für das mittelfristige Eintreten (Beobachtungszeitraum 2 Jahre) eines kardiovaskulären Ereignisses (Herzinfarkt, Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit Grad 4 und plötzlicher Herztod). Besonders gefährdet scheinen Patienten mit HMA – Werten <60% nach der Hämodialyse zu sein.³⁹

Bei Diabetikern (Typ 2, nicht insulinpflichtig) findet sich eine Reduktion von HMA und eine zugehörige Erhöhung von HNA, welche mit schlechterer Blutzuckerkontrolle ausgeprägter zu sein scheint (negative Korrelation mit HbA1c). Jedoch scheint der Grad der oxidativen Schädigung insgesamt nicht so ausgeprägt wie bei niereninsuffizienten Patienten.⁴¹ Oxidative Veränderungen des HSA finden sich bei leber- und nierengesunden Patienten vor elektiv chirurgischen Eingriffen (allgemein- oder herzchirurgisch) in ähnlicher Ausprägung wie bei Diabetikern. Die Höhe des HMA war bei herzchirurgischen Patienten etwas niedriger als bei den sonstigen Patienten, wobei es in beiden Gruppen zu einem weiteren Absinken des HMA nach der Operation und in weiterer Folge zu einer postoperativen Erholung kommt.⁴²

Sepsispatienten, welche durch die generalisierte Infektion einer massiven Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt sind, zeigen erwartungsgemäß deutlich erhöhte Werte für HNA1 und HNA2. In einer Studie an Leberzirrhotikern wurden Patienten mit Sepsis als Vergleichspersonen untersucht, wobei sich ein Verteilung der HMA, HNA1 und HNA2 - Werte vergleichbar mit stabilen Leberzirrhotikern zeigte. Insbesondere die Höhe des irreversibel oxidierten Albumins erreichte jedoch bei weitem nicht jene bei Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen.⁴³

Tabelle 1A gibt einen Überblick über den derzeitigen Stand der Literatur zu Messungen der oxidativ veränderten Albuminfraktionen im Blut von Patienten mit extrahepatischen Erkrankungen.

1.3.2 Albuminfraktionen bei Lebererkrankung

Die Beschreibung der oxidierten Albuminfraktionen bei Lebererkrankungen findet sich ab 1985, wobei Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen untersucht wurden. Es finden sich in dieser Arbeit nur sehr eingeschränkte Patientenzahlen.⁴⁴ Neben gesunden Kontrollpersonen wurden Patienten mit nicht näher spezifizierter chronischer Hepatitis (n=23), kompensierter (9) und dekomensierter (9) Leberzirrhose, hepatozellulärem Karzinom auf dem Boden einer Leberzirrhose (10), alkoholischer Hepatitis (5) und akutem Leberversagen (2) untersucht. Es zeigten sich HMA Fraktionen von 33 – 64% bei Patienten mit Lebererkrankung und damit eine deutliche Reduktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen (75%). Eine nähere Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse findet sich in dieser japanischen Arbeit nicht.

Weitere Berichte über oxidativ verändertes Albumin bei Lebererkrankung (iel bei Leberzirrhose) finden sich erst ab 2006 in Abstractform, sowie ab 2007 in Originalartikel- und Reviewform, im Wesentlichen von der Forschungsgruppe der Medizinischen Universität Graz.^{25,43,45,46,47,48,49}

Zusammenfassend zeigen sich bei Auftrennung der zuvor beschriebenen Albuminfraktionen (HMA, HNA1 und HNA2) mittels HPLC deutlich erhöhte Anteile der oxidativ veränderten Fraktionen HNA1 und HNA2 bei Patienten mit Leberzirrhose, insbesondere bei dekomensierter Leberzirrhose, wobei der Grad der Oxidation mit der Schwere der Lebererkrankung zusammenzuhängen scheint. So werden bei

beschwerdefreien Patienten, welche zum Teil ambulant betreut werden können und die sich in einem stabilen, kompensierten Stadium der Leberzirrhose befinden HMA, HNA1 und HNA2 - Werte von 45 – 53%, 39 – 47% bzw. 7-8% gemessen. ^{43,46,49} Bei Patienten mit dem Krankheitsbild des akut-auf-chronischen Leberversagens (ACLF) ⁵⁰, welches durch eine rasche Dekompensation einer vorbekannten Leberzirrhose durch einen auslösenden Mechanismus (häufig Infektion, Alkoholabusus, gastrointestinale Blutung etc.) charakterisiert ist, und aufgrund der Schwere der Erkrankung meist mit einer Betreuung auf der Intensivstation einhergeht, zeigen sich hingegen Werte von 13-18 %. Es handelt sich dabei um die höchsten gemessenen Werte für HNA1 und insbesondere für HNA2, welche in der Literatur berichtet sind. Diese weisen nicht nur auf eine massive Belastung durch oxidativen Stress bei Patienten mit ACLF, sondern auch auf eine reduzierte bis fehlende Reduktionskapazität des Organismus für Serumalbumin hin, wie der Vergleich zu Patienten mit Sepsis zeigt. Die oxidative Belastung des Organismus bei Sepsis ist vermutlich vergleichbar mit jener bei ACLF, jedoch scheint der lebergesunde Patient aufgrund noch vorhandener Reduktionskapazitäten weniger anfällig für irreversible Oxidation des Albumins zu sein als derjenige mit Leberinsuffizienz.

Mit extrakorporalen Leberersatzverfahren wie MARS® (Molecular Adsorbents Recirculating System, Gambro AB, Lund, Schweden) und Prometheus® (Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) ist es möglich, bei schwer leberinsuffizienten Patienten HMA signifikant zu erhöhen und HNA1 (teils signifikant) zu senken. Ein ähnlicher Effekt konnte auch vor und nach Hämodialyse beobachtet werden und könnte sich in Analogie dazu auf die Dialyse-Komponente der Leberersatzverfahren zurückführen lassen. ³⁶ Im Hinblick auf HNA2 zeigt sich jedoch kein Effekt der extrakorporalen Verfahren. ⁴⁷

Kürzlich wurde von der Grazer Forschungsgruppe die prognostische Wertigkeit des irreversibel oxidierten Albumins (HNA2) zur Prognoseabschätzung bei dekompensierter Leberzirrhose untersucht. Es konnte eine Überlegenheit von HNA2 in Bezug auf die Vorhersage der Kurzzeitmortalität (30 und 90 Tage) im Vergleich zum derzeit hierfür am besten validierten Krankheitscore MELD (Model of end-stage liver disease ⁵¹) an einer Kohorte von 39 Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose und 15 Patienten mit ACLF gezeigt werden. ⁴⁹

Veränderungen der Albuminoxidation sind bisher nur bei zirrhotischen Lebererkrankungen beschrieben. Beschreibungen bei nicht-zirrhotischen Lebererkrankungen, insbesondere bei infektiöser Hepatitis, existieren derzeit nicht. Tabelle 1B gibt einen Überblick über den derzeitigen Stand der Literatur zu Messungen der oxidativ veränderten Albuminfraktionen bei Patienten mit Lebererkrankungen.

Publikation	Jahr	Krankheitsbild	n	HMA	SD	HNA1	SD	HNA2	SD	Kommentar
A										
Sogami	1985	Chronische Niereninsuffizienz	28	51,0	9,6	-	-	-	-	
Soejima	2004	Hämodialyse	13	59,6	8,9	38,2	8,7	2,2	0,5	pre Dialysis
				76,0	8,4	21,7	8,0	2,3	0,6	post Dialysis
		Chron. Niereninsuffizienz								
Terawaki	2004	(ohne Dialyse)	55	69,4	7,3	28,6	6,9	2,0	0,7	
		Hämodialyse - Patienten ohne kardiovaskulärem Ereignis								
Terawaki	2010	Ereignis	66	44,7	9,9	50,1	9,1	5,2	1,7	pre Dialysis
				67,5	7,3	28,9	6,9	3,6	0,9	post Dialysis
		Hämodialyse - Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis								
			20	36,7	5,8	57,3	5,7	6,0	2,0	pre Dialysis
				57,3	6,0	38,5	5,1	4,2	1,5	post Dialysis
Regazzoni	2013	Hämodialyse - Patienten	8	42,0	7,0	58,0	7,0	-	-	pre Dialysis
				63,0	8,0	37,0	7,0	-	-	post Dialysis
Suzuki	1992	NIDDM	47	63,0	6,7	-	-	-	-	
Hayakawa	1996	Chirurgischer Eingriff Herzoperation	83	63,6	5,0	-	-	-	-	
			14	61,5	6,2	-	-	-	-	
Oettl	2013	Sepsis	18	49,0	17,0	44	17	8	5	

B

Sogami	1985	Chronische Hepatitis	23	64,0	5,3	-	-	-	-
		Akute Hepatitis	5	64,0	4,6	-	-	-	-
		Kompensierte Leberzirrhose	9	64,0	5,0	-	-	-	-
		Dekompensierte Leberzirrhose	9	49,0	7,6	-	-	-	-
		Hepatozelluläres Karzinom	10	52,0	7,3	-	-	-	-
Oetzl	2008	Kompensierte Leberzirrhose	10	53,3	5,3	39,6	6,1	7,5	2,4
		ACLF	8	42,7	10,0	41,4	7,4	15,4	3,4
Oetzl	2009	ACLF, vor MARS-Therapie	8	31,2	21,6	50,5	17,5	18,3	6,3
		ACLF, nach MARS-Therapie	8	40,7	17,2	41,8	14,3	17,5	5,6
		ACLF, vor PROMETHEUS-Therapie	8	30,0	21,5	51,3	17,5	18,7	6,0
		ACLF, nach PROMETHUS-Therapie	8	36,9	16,8	45,3	14,3	17,8	5,7
Oetzl	2013	Kompensierte Leberzirrhose	20	47,0	20,0	46,0	18,0	8,0	5,0
		ACLF	9	43,0	14	42	15	15	3
Stauber	2014	Kompensierte Leberzirrhose	39	45,0	16	47	14	8	4
		ACLF	15	45,0	12	42	12	13	4

NIDDM, nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus; ACLF, acute-on-chronic liver failure; -, nicht gemessen oder berichtet

Tabelle 1

Zusammenfassung der bisher publizierten Daten zu Messungen der oxidierten Albuminfraktionen bei Patienten ohne (A) und mit (B) zugrundeliegender (zirrhotischer) Lebererkrankung

1.3.3 Albuminfraktionen bei kommerziell erhältlichem humanem Serumalbumin

Kommerziell erhältliche Albuminlösungen enthalten nicht ausschließlich reduziertes Albumin, wenngleich unklar ist, ob diese oxidative Veränderung Auswirkungen auf die Wirksamkeit und Funktionalität in vivo hat. Möglicherweise stellt sie jedoch neben anderen, hier nicht diskutierten Faktoren, einen Grund für die weitgehende Unwirksamkeit der Albumintherapie bei der Mehrzahl der bisher untersuchten (extrahepatischen) Krankheitsbilder dar.⁶

Bereits 1988 konnte bei Untersuchungen mehrerer Albuminlösungen (Hersteller: AB KABI, Calbiochem Behring Corp, Nippon Seiyaku Co, Chemo-Sero-Therapeutic Institute) mittels HPLC ein HNA-Gehalt von lediglich 43 – 65% festgestellt werden, wobei eine Differenzierung des HNA in HNA1 und HNA2 nicht berichtet wurde.³⁴

Oettl und Marsche konnten 2010 bei Untersuchung einer humanmedizinisch verwendbaren 20%igen Albuminlösung der Fa. CSL Behring GmbH, Wien, Österreich einen Gehalt von 41% HNA1 und 9% HNA2 feststellen. Diese Charakteristika entsprechen dem Serum eines Patienten mit kompensierter Leberzirrhose (siehe Tabelle 1). Die Ursachen dieser hochgradigen Albuminoxidation bei medizinischen Humanalbuminlösungen ist unklar, jedoch kann über eine Oxidation während der Herstellung und den Einfluss der Stabilisatoren während der Lagerung spekuliert werden.

1.4 Relevanz der Albuminoxidation und physiologische Implikationen bei Lebererkrankung

Albumin ist beim Patienten mit Leberzirrhose quantitativ vermindert. Mit zunehmender Erkrankungsschwere nimmt Albumin, welches von der Leber produziert wird, als Zeichen der Synthesestörung, ab. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien wird dieser Effekt durch die hinzukommende Malnutrition der Patienten verstärkt.⁵² Die Wichtigkeit des Albumin-Serumspiegels bei Leberzirrhose ist seit mehr als einem halben Jahrhundert Teil der

hepatologischen Praxis: Albumin wurde 1964 als Teil eines Scores zur Abschätzung des Blutungsrisikos von Ösophagusvarizen bei Patienten mit Leberzirrhose und damit als Surrogat der Krankheitsprognose von Child und Turcotte eingesetzt (in diesem zunächst verwendeten Score ging neben dem Albumin-Serumspiegel auch der subjektiv eingeschätzte Ernährungszustand des Patienten ein).⁵³ Dieser Score wurde 1973 von Pugh et al. bei Patienten, welche aufgrund einer akuten Ösophagusvarizenblutung chirurgisch behandelt wurden, angepasst und wird noch heute häufig verwendet.⁵⁴ Kommerziell erhältliches humanes Serumalbumin wurde zum Ausgleich des erniedrigten Albuminspiegels, speziell in der Intensivmedizin und bei Lebererkrankungen mit wechselndem Erfolg eingesetzt. Die heute verbliebenen medizinischen Indikationen stellen zum großen Teil hepatologische Krankheitsbilder dar, bei denen eine Verhinderung von Komplikationen (z.B. der renalen Dysfunktion nach Paracentese) bzw. eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes (der spontan bakteriellen Peritonitis) gezeigt werden konnte (siehe Kapitel: Albumin allgemein).

Diese Krankheitsbilder sind, wie bereits dargestellt, mit einer Verschiebung der Albuminfraktionen hin zu oxidierten bzw. höhergradig oxidierten Formen assoziiert (siehe Kapitel: Albuminfraktionen bei Lebererkrankung). Die qualitative Veränderung des Serumalbumins des Patienten mit Lebererkrankung, welche sich unter anderem in der Albuminoxidation widerspiegelt, zeigt einerseits die Krankheitsschwere und Prognose der Patienten⁴⁹ – im Sinne eines Biomarkers – an, scheint jedoch auch funktionelle Implikationen zu haben, deren Ausmaß und pathophysiologische Bedeutung bisher weitgehend unbekannt sind. In Bindungsversuchen mit dem Liganden der Bindungsstelle II nach Sudlow (hier wird unter anderem Bilirubin gebunden) Dansylsarcosin bei Patienten mit Leberzirrhose und ACLF konnten deutlich schlechtere Bindungseigenschaften des Serums von leberkranken Patienten für Dansylsarcosin im Vergleich zu Kontrollpersonen gezeigt werden, welche bei ACLF noch deutlich stärker als bei stabiler Leberzirrhose beeinträchtigt war.⁴³

Der Effekt der eingeschränkten Bindung für Dansylsarcosin dürfte jedoch nicht ausschließlich auf die (reversible oder irreversible) Oxidation an Cys-34 zurückzuführen sein, denn HNA2 zeigte ausschließlich bei Zirrhotikern und nicht bei Patienten mit Sepsis (und erhöhten HNA2 Spiegel) eine signifikante Korrelation zur Bindungskapazität. Dies lässt weitere, von der Oxidation des Cys-34 unabhängige, funktionelle Einschränkungen

des Albumins bei Patienten mit Leberzirrhose vermuten.

Inwiefern die Oxidation an Cys-34 auch die Bindung von klinisch relevanten Substanzen, welche (auch) an der Bindungsstelle I nach Sudlow binden (zB Warfarin ⁵⁵, Verapamil ⁵⁶, Sulfonylharnstoffen ⁵⁷, Nichtsteroidale Antirheumatika ⁵⁸, Phenytoin ⁵⁹), beeinträchtigt und inwiefern eine möglicherweise analog zu Dansylsarcosin eingeschränkte Bindungskapazität klinisch-medizinisch relevant sein könnte, wurde bisher (wie beispielsweise der Einfluss der Albumin-Glykierung auf die Sudlow I und II Bindung ⁶⁰) nicht beforscht und ist unklar.

Die Quelle der reaktiven Radikalverbindungen und damit der (höhergradigen) Albuminoxidation bei Patienten mit Leberzirrhose ist noch nicht vollständig geklärt, wogegen diese Mechanismen beim alkoholischen Leberschaden (ALD) detaillierter erforscht sind. Bei ALD führen zahlreiche Mechanismen, unter anderem die Aktivierung von ROS-produzierenden Kupffer-Zellen durch erhöhte Endotoxin-Spiegel, ein erhöhter Anfall von ROS über Cytochrome (P450-Komplex) bei der Detoxifikation von Alkohol und eine Alkohol-induzierte mitochondriale Dysfunktion in Kombination mit einer hepatischen Glutathion-Depletion zu oxidativem Stress.⁶¹ Bekannt ist ebenfalls eine Dysfunktion neutrophiler Granulozyten – einer weiteren wichtigen Quelle freier Sauerstoffradikale im Körper – im Sinne einer erhöhten Ausschüttung von ROS in Ruhe bei Patienten mit alkoholischer Hepatitis.⁶² Zudem sind bei kompensierter alkoholischer Leberzirrhose neutrophile Granulozyten bereits in Ruhe aktiviert (erhöhtes Priming).⁶³ Ob und inwieweit eine vermehrte Albuminoxidation bei Lebererkrankung mit den genannten Phänomenen der Neutrophilendysfunktion assoziiert sind, ist unbekannt.

Ob und welche Rolle die Leber in der (Patho)Physiologie der Albuminoxidation und –reduktion auf zellulärer Ebene spielt, ist ebenfalls ungeklärt. Zwar scheint eine entscheidende Rolle auch vor dem Hintergrund der Leber als zentralem Organ der körpereigenen RedOx – Homöostase (die Leber ist unter anderem eines der Organe mit dem höchsten Gehalt an Glutathion) plausibel, experimentelle Evidenz dazu existiert jedoch nicht.^{64,65} Hinsichtlich der Pathophysiologie ist ebenfalls unbekannt, ob sich die Zusammensetzung der Albuminfraktionen in Bezug auf ihre oxidative Veränderung zwischen portalvenösem Blut (Einstrom in die Leber), Lebervenenblut (Ausstrom aus der

Leber) und gemischtvenösem Blut unterscheidet. Ein solcher Unterschied wäre für die in einem dynamischen Gleichgewicht stehenden Fraktionen HMA und HNA1 eher als für HNA2 plausibel und könnte die Leber als mutmaßlich zentrales Organ der Albuminreduktion einzugrenzen helfen.

Zusammenfassend kann also dem aktuellen Stand der Forschung entsprechend von einer (höhergradigen) Oxidation und einer eingeschränkten Funktionalität des Serumalbumins bei Patienten mit Leberzirrhose ausgegangen werden. Diese nimmt mit steigender Krankheitsschwere zu und könnte zum Teil auf einer verstärkten oxidativen Veränderung des Albumins an Cys-34 bei diesem Krankheitsbild beruhen. Das Konzept der „effektiven Albuminkonzentration“ berücksichtigt diese, nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Beeinträchtigung des Albumins beim Zirrhotiker.^{14,66} Mit welcher Methode die funktionelle Veränderung des Albumins objektiviert werden kann (z.B. Fettsäurebindung⁶⁷), ist jedoch ungeklärt und bedarf ebenso weiterer Forschung wie die Frage, ob ein etwaiger therapeutischer Eingriff zur Verbesserung der Albuminfunktion klinisch relevante Auswirkungen hätte. Ebenso sind zahlreiche pathophysiologische Fragen zum Einfluss der Leber und deren RedOx – Systemen auf Albumin unbeforscht.

1.5 Ziele der Dissertation

In Vorstudien konnten beträchtliche Unterschiede der Zusammensetzung des Gesamtalbumins aus den eingangs definierten oxidativ veränderten Subfraktionen in Bezug auf das zugrundeliegende Krankheitsbild, insbesondere bei verschiedenen Stadien der Leberzirrhose, gezeigt werden. Ein prognostischer Wert des irreversibel oxidierten Albumins HNA2 hinsichtlich des Kurzzeitüberlebens wurde an einer eingeschränkten Fallzahl von Patienten evaluiert und zeigte vielversprechende Ergebnisse.

Ziele dieser Dissertation sind:

- Die Fortführung der Charakterisierung der Oxidationsstufen des humanen Serumalbumins bei Patienten mit alkoholischer und durch chronischer Hepatitis C (CHC) verursachter Leberzirrhose sowie bei nicht-zirrhosischen Patienten mit CHC. Dies geschieht im Vergleich zu den bisher publizierten Studien an einer größeren Anzahl von Patienten.
- Die Klärung eines möglichen Einflusses der Neutrophilen(dys)funktion auf den Oxidationsstatus des Albumin von Patienten mit CHC.
- Die Validierung der prognostischen Wertigkeit der oxidativ veränderten Albumin-Subfraktionen in Hinblick auf das Patientenüberleben.
- Der Vergleich der durch die Bestimmung aus venösem Mischblut gewonnenen Messwerte der Albumin-Subfraktionen mit Proben aus Lebervenenblut, welches zum gleichen Zeitpunkt abgenommen wurde mit der Fragestellung eines methodischen Unterschiedes zwischen diesen Entnahmeorten.
- Der Vergleich zweier Auswertemethoden zur Vermessung der HPLC Kurven für HMA, HNA1 und HNA2 hinsichtlich einer möglichen systematischen Abweichung der Auswertung mittels Peakhöhen im Vergleich mit jener mittels Peakflächen.

2 Methoden

2.1 Patienten

Es wurden zu Zwecken der Charakterisierung des HSA Patienten mit Leberzirrhose und/oder CHC an der Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Universitätsklinik für Innere Medizin sowie der Medizinischen Intensivstation der Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz, rekrutiert. Dies erfolgte im Rahmen der klinischen Studien „CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study“ sowie „Neutrophilenfunktion bei chronischer Hepatitis C“.

Weiters wurden HPLC – Messungen und Datenanalysen bei auswärts rekrutierten Patienten (im Rahmen des multinationalen europäischen Konsortiums „CLIF – Chronic Liver Failure“, <http://www.clifconsortium.com/centres.php> über die Studie „CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study – CANONIC“) durchgeführt. Dies erfolgte in erster Linie zur Erhöhung der Fallzahl und Validierung der intern gemessenen und ausgewerteten Daten. Hierfür wurde ein Antrag für eine Substudie zur CANONIC – Studie an das CLIF – Studienzentrum (Barcelona, Spanien) eingereicht und genehmigt.

Die Sicherung der Diagnose Leberzirrhose bzw. CHC erfolgten im Rahmen der Routinebetreuung der Patienten an der Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie durch Bildgebung (Ultraschall, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie), nichtinvasive Fibroseschätzung (FibroScan[®], Echosens S.A.S.U., Paris, Frankreich) oder Leberpunktion bzw. durch eine mehr als sechs Monate nachweisbare Hepatitis C – Viruslast (HCV RNA – PCR). Es wurden Patienten mit Leberzirrhose jedweder Ätiologie und CHC Patienten jeden Genotyps eingeschlossen. Es bestand kein Alterslimit. Der Schweregrad der Lebererkrankung wurde mittels gängiger hepatologischer Einteilungssysteme (Child-Pugh-Score von 5-15 Punkte / - Klassen A,B,C bzw. MELD-Score mit UNOS - Modifikation)^{51,54} gemessen und eingeteilt.

Für die Details der Ein- und Ausschlusskriterien wird auf die jeweiligen Studienprotokolle verwiesen.

2.2 Messungen und Analysen

2.2.1 Allgemein

Klinische Parameter und Standardlaborparameter wurden im Rahmen der routinemäßigen Patientenbetreuung erhoben und dokumentiert. Hierzu zählen das Blutbild, Klinische Chemie (inklusive Nieren-, Leber- und Stoffwechselwerte) sowie Gerinnungsparameter. Seitens der klinisch erhobenen Parameter wurde neben körperlichem Status, Körpergröße, -gewicht, Herzfrequenz, Blutdruck, und Infektzeichen (Körpertemperatur u.a.) besonders auf die zur Einteilung des Schweregrades der Lebererkrankung erhobenen Zeichen der dekompensierten Lebererkrankung (hepatische Enzephalopathie und Ascites) abgestellt.

Bei Patienten mit Leberzirrhose erfolgt die Einteilung nach Ursache der Leberzirrhose in: Alkohol, Nichtalkoholische Steatohepatitis, Chronische Hepatitis B oder C und kryptogen (keine Ursache objektivierbar).

Die Blutproben jener Patienten, welche an der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Universität Graz betreut wurden, wurden in einem Zug mit der Routineblutabnahmen durchgeführt, bei 4°C gekühlt und zeitnah (< 30 min) weiterverarbeitet. Dies geschah unter anderem in Hinblick auf die bekannte Empfindlichkeit der Albuminsubfraktionen hinsichtlich Lagerung bei höheren Temperaturen als -80°C.

Auswärts präanalytisch verarbeitetes Probenmaterial (CANONIC - Studie) wurde nach den Vorgaben des Studienzentrums verarbeitet. Diese sahen eine Lagerung der Bioproben bei -80°C am Studienzentrum bis zum Versand an die zentrale Biobank (HCB-IDIBAPS, Barcelona, Spanien) vor. Der Versand zur und von der Biobank geschah auf Trockeneis. Vorgaben zur Probenverarbeitung vor Einfrieren wurden nicht gemacht. Diese Proben wurden nach Sammlung durch die zentrale Biobank im November 2013 zur Analyse nach Graz geschickt, die daraus vorgesehenen HPLC – Messungen im Dezember 2013 sowie Jänner 2014 durchgeführt.

2.2.2 Albuminfraktionen

2.2.2.1 Messung

Die Messung der oxidativ veränderten Albuminfraktionen erfolgte am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz mittels des dort etablierten HPLC-Protokolls.⁴⁶ Hierzu werden Plasmaproben mit 0.1 M Natriumphosphat und 0.3 M Natriumchlorid bei pH 6.87 verdünnt und gefiltert (Whatman 0.45 µm Nylon-Filter). 20 µL dieser Lösung werden in das HPLC System (Shimadzu, Kyoto, Japan) eingebracht. Die Auftrennung erfolgt über eine Shodex Asahipak ES-502N 7C Säule (7.5×100 mm) mit 50 mM Natriumacetat und 400 mM Natriumsulfat, pH 4.85 als mobile Phase. Die Messung erfolgt über Fluoreszenz bei 280/340 nm und UV Absorption bei 280 nm mittels eines Jasco 821FP Fluoreszenz- und eines Waters 2487 UV/VIS-Detektors. Die Darstellung der HPLC Kurven erfolgte mittels einer zum HPLC System gehörigen Software (Shimadzu, Kyoto, Japan) am PC. Ein Teil der Messungen wurde vom medizinisch-technischen Personal des Institutes für Physiologische Chemie durchgeführt.

Die Messung wurde an folgenden Patientenkollektiven durchgeführt:

- Akut aufgrund einer Dekompensation ihrer Leberzirrhose hospitalisierte Patienten (Grazer Kohorte)
- Akut aufgrund einer Dekompensation ihrer Leberzirrhose hospitalisierte Patienten (CLIF – CANONIC Kohorte)
- Patienten, bei denen eine Lebervenenkatheteruntersuchung durchgeführt wurde (Messung aus Lebervenenblut und venösem Mischblut)
- Patienten mit CHC und stabiler Leberzirrhose (vor Beginn einer antiviralen Therapie)
- Patienten mit CHC ohne Leberzirrhose (vor Beginn einer antiviralen Therapie)

2.2.2.2 Quantifizierung

Die durch die HPLC erhaltenen Messkurven wurden am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz softwaregestützt ausgewertet, um die Werte für HMA, HNA1 und HNA2 zu quantifizieren. Es wurden nur Messkurven ausgewertet, die ein abgrenzbares Muster von HMA, HNA1 und HNA2 zeigten.

Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze verwendet, deren Vergleich unter anderem Ziel dieser Dissertation ist: die Quantifizierung der Albuminfraktionen

- als Verhältnis der Peakhöhen zueinander und
- als Verhältnis der Peakflächen zueinander.

Die Quantifizierung der Albuminfraktionen mittels Peakhöhe wird bisher als Standardmethode am Institut für Physiologische Chemie verwendet. Es wurden dabei in der zum HPLC System gehörigen Software manuell (Laufzeit) Bereiche definiert, in denen die Software selbständig den „Peak“ als höchste Auslenkung der Kurve feststellt. Obwohl dies für HMA und HNA1 problemlos funktioniert, ist so die Feststellung des HNA2 Gehaltes der Probe nicht direkt möglich. Da die Probe in der Regel einen deutlich geringeren Gehalt an HNA2 als HNA1 aufweist, und die nahe zusammenliegenden Peaks von HNA1 und HNA2 somit zu einer „Schulter“ des HNA1 – Peaks verschmelzen, muss die Position und damit die Höhe des HNA2 – Peaks nachträglich optisch definiert werden. Die Gesamthöhe der Peaks (=100%) und die Subfraktionen wurden von der Software als Absolutwerte ausgegeben.

Für die Quantifizierung der Albuminfraktionen über die Peakflächen wurde das HPLC – Messfile in das Softwareprogramm Peakfit® (Systat Software Inc, San Jose, Kalifornien, USA) geladen. Die Messkurve wird bei diesem Ansatz durch manuelles Setzen und Korrigieren von Normalverteilungskurven nachempfunden. Die Passgenauigkeit der Normalverteilungskurven im Hinblick auf die Resultierende (Messkurve) kann in einem Kontrollfenster zeitgleich kontrolliert werden. Diese Methode erlaubt somit eine eindeutigere Definition des HNA2 – Peaks als die Quantifizierung über die Peakhöhen und liefert möglicherweise im Vergleich zu dieser Methode systematisch andere Messwerte. Ein direkter Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden wurde bisher noch nicht

durchgeführt und ist Teil dieser Dissertation.

Die Flächen der händisch gesetzten Peaks wurden ebenso wie die Gesamtfläche von der Software als Absolutwerte ausgegeben.

Ein Teil der Quantifizierungen wurde vom medizinisch-technischen Personal des Institutes für Physiologische Chemie durchgeführt.

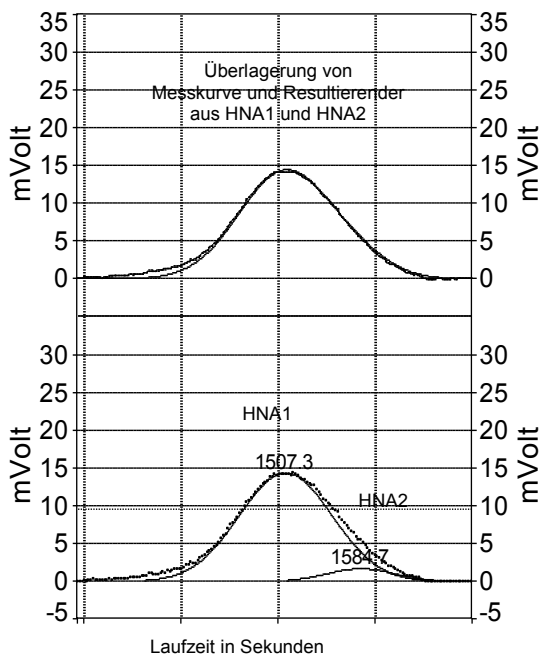


Abbildung 3

Quantifizierung der HPLC – Kurven über die Peakflächen am Beispiel einer HNA – Kurve. Es werden zwei händisch eingefügte Normalverteilungskurven (HNA1 und HNA2, unten) erstellt. Die Resultierende aus diesen Teilkurven (oben) kann mit der Messkurve abgeglichen werden, die Teilkurven werden bis zur optimalen Passgenauigkeit adaptiert.

2.2.3 Funktion neutrophiler Granulozyten

Es wurde bei Patienten mit CHC die Funktion neutrophiler Granulozyten bzw. deren Dysfunktion erhoben und quantifiziert: Als Surrogatparameter der Neutrophilenfunktion werden die Fähigkeit, Bakterien zu fressen (Phagozytose) sowie die Fähigkeit, mit und ohne Stimulation reaktive Sauerstoffradikale auszuschütten (Burst), herangezogen. Dies wurde unter Zuhilfenahme der kommerziell erhältlichen Tests Phagotest® und Phagoburst® (beide: Glycotope, Heidelberg, Deutschland) am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität (Arbeitsgruppe Assoz.-Prof. Dr. Stadlbauer-Köllner) durchgeführt. Die in die gegenständliche Arbeit einfließenden

Ergebnisse werden von diesem Labor zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

Phagotest® liefert Information über die qualitative (Anzahl der phagozytierenden Zellen) und quantitative (phagozytierte Bakterien pro Zelle) Fähigkeit zur Phagozytose von *E.coli* durch neutrophile Granulozyten und Monozyten. Das Patienten – Vollblut wird zunächst mit FITC (Fluorescein isothiocyanat)-markierten Bakterien (*E.coli*, opsonisiert mit Komplement C3b und Antikörpern) inkubiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C wird die Phagozytose gezielt gestoppt (Kühlung auf 0°C), anschließend die Erythrozyten lysiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mittels Durchflusszytometrie nach Anregung durch einen Argon-Ionen Laser bei 488nm. Durch Vergleich mit einer Kontrollprobe (Probe des Patienten, welche statt bei 37°C für 10 Minuten bei 0°C inkubiert wird und somit die Eigenfluoreszenz der Zellen widerspiegelt) wird der Prozentsatz jener Zellen ermittelt, die zumindest ein Bakterium phagozytiert haben. Die Intensität der Fluoreszenz gibt Aufschluss über die Menge der phagozytierten Bakterien.

Phagoburst® misst ebenfalls über Durchflusszytometrie (Argon-Ionen Laser bei 488nm) die durch oxidativen Burst umgesetzte Menge des Fluorogens Dihydrorhodamin. Durch Inkubation mit verschiedenen Stimuli (opsonisierte *E.coli*, Phorbol 12- Myristat 13-Acetat [PMA] als starker Reiz und N-formyl-MetLeuPhe [FLMP] als schwacher Reiz) kann die Fähigkeit zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen in die Phagolysosomen von Neutrophilen und Monozyten bestimmt werden. Einerseits wird durch die Messung der Fluoreszenz die grundsätzliche Funktion der Zellen dargestellt, Sauerstoffradikale zu bilden und andererseits über die Intensität der Fluoreszenz die Aktivität quantifiziert.

2.2.4 Hepatitis C

Die Messungen der HCV – PCR und die Bestimmung des HCV – Genotyps wurden am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Die Höhe der HCV – RNA wurde aus Serumproben in einem ISO 9001:2008-zertifizierten Labor (Labor für molekulare Erregerdiagnostik, IHMEM, Leiter: Univ. Prof. Dr. Harald Kessler) vom dortigen medizintechnischen Personal durchgeführt. Verwendet wurde hierfür der “COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, Version 2.0”

(Roche Molecular Systems Inc., Branchburg, New Jersey, USA), welches nach den Herstellervorgaben betrieben wurde. Das Testsystem verwendet eine automatische Probenvorbereitung mittels des "COBAS AmpliPrep" - Systems (Roche), welches mit einem "COBAS TaqMan" – Messinstrument zur real-time PCR verknüpft ist. Die Detektions- und Quantifizierungsgrenzen liegen bei 15 IU HCV RNA/ml. Die HCV – Genotypen wurden mit dem "TRUGENE HCV Genotyping Kit" (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, New York, USA) nach Herstellervorgaben bestimmt.

2.2.5 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS® 21 bzw. 22 (IBM, New York, USA) durchgeführt.

2.2.5.1 Deskriptive Statistik

Je nach Verteilung der Variablen (Normalverteilung oder andere) werden unterschiedliche Lage- und Verteilungsmaße angegeben: Für normalverteilte Daten werden Mittelwert und Standardabweichung, für nicht-normalverteilte Daten Median und erstes/drittes Quartil (Q1, Q3) angegeben, wobei mittels Kolmogorow-Smirnow-Test oder Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung überprüft wird.

Die grafische Darstellung erfolgt durch Boxplots oder Punktwolken.

Korrelationen werden mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (lineare Beziehung) oder des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (nichtlineare Beziehung) berechnet.

2.2.5.2 Gruppenvergleiche

Zum Vergleich zweier Gruppen einer metrischen Variablen auf signifikanten Unterschied werden t-Test (bei Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Test (andere) berechnet. Bei mehr als zwei (nicht verbundenen) Gruppen werden ANOVA (Normalverteilung) oder Kruskal-Wallis-Test (andere) berechnet. Kategoriale Variablen werden mit Fisher's-Exact-

oder Chi-Quadrat-Test verglichen.

Ergebnisse werden bei $p \leq 0,05$ als signifikant interpretiert.

2.2.5.3 Überlebensanalysen

Für die Testung von HNA1 und HNA2 als Prognoseparameter bei dekompenzierter Leberzirrhose wurden ROC (Receiver Operated Characteristic) berechnet und die AUROC (Area Under ROC) angegeben. Mittels ROC werden Sensitivität und Spezifität (eigentlich die Falsch-positiv-Rate = $1 - \text{Spezifität}$) einer metrischen Variablen in Hinblick auf einen vorgegebenen Endpunkt grafisch dargestellt. Als Endpunkt dieser Berechnungen wird das binär codierte Überleben (0=Tod, 1=Überleben) zu den Zeitpunkten 30d, 90d und 365d herangezogen. Zur Ermittlung des optimalen Wertes der Variablen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität wurde der Youden-Index (= Sensitivität + Spezifität - 1) berechnet.⁶⁸ Der Vergleich der AUROCs erfolgt mit jenen für etablierte Prognoseparameter wie MELD und Child-Pugh-Score. Die Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes zwischen AUROCs erfolgt nichtparametrisch mittels des Tests nach De Long bei Stichprobengrößen über 100 Patienten.⁶⁹

2.2.5.4 Methodenvergleich

Die Untersuchung einer etwaigen systematischen Abweichung zwischen den Quantifizierungsmethoden für HPLC – Kurven “Peakhöhe” und “Peakfläche” wird mit der Methode nach Bland und Altman durchgeführt.⁷⁰ Hierbei wird aus Messwertpaaren (jeweils Messergebnis der identischen Kurve mit Methode 1 und 2) das arithmetische Mittel und die Differenz berechnet. Mittelwerte und Differenzen aller untersuchten Proben werden in ein Koordinatensystem (x-Achse: Mittelwert, y-Achse: Differenz) übertragen. Der Mittelwert aller Differenzen sowie dieser \pm Standardabweichung * 1,96 werden als horizontale Linien in das Diagramm eingezeichnet. Mittels eines Einstichproben t-Tests wird eine signifikante Abweichung des Mittelwertes der Differenzen von 0 überprüft. Bei Gleichheit der Messmethoden existiert kein signifikanter Unterschied von 0.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose

3.1.1 Albuminfraktionen bei Patienten mit akuter Dekompensation einer Leberzirrhose (Kohorte Graz)

Es konnten von April bis August 2011 33 Patienten mit ungeplanter Krankenhausaufnahme im Rahmen der Studie „*CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study*“ an der Universitätsklinik für Innere Medizin identifiziert werden. Sechs Patienten wurden nicht eingeschlossen (fünf verweigerten ihr Einverständnis, eine Patientin verstarb innerhalb von 24h), von den verbliebenen und eingeschlossenen 27 Patienten wurden klinische und biochemische Parameter erhoben und Serumproben lt. Studienprotokoll asserviert. Die von diesen Patienten erhobenen Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Alter [a]	58 (51; 68)		
Geschlecht (weibl)	19%		
Ätiologie der Leberzirrhose			
Alkohol	96%	(26/27)	
Chronische Hepatitis C	4%	(1/27)	
Ursache der ungeplanten Krankenhausaufnahme			
Gastrointestinale Blutung	37%	(10/27)	
Ascites	30%	(8/27)	
Akutes Nierenversagen	19%	(5/27)	
Infektion	11%	(3/27)	
Hep. Encephalopathie	4%	(1/27)	
Child Pugh Score	10 (8; 12)		
Child Pugh Klasse A	0%	(0/27)	
Child Pugh Klasse B	41%	(11/27)	
Child Pugh Klasse C	59%	(16/27)	
MELD	18 (14; 25)		

MELD: model of end stage liver disease

Tabelle 2

Baseline-Daten von 27 Patienten, welche an der Universitätsklinik für Innere Medizin aufgrund einer akuten Dekompensation ihrer Leberzirrhose behandelt wurden

Wie vorgesehen wurde aus o.g. Proben der Oxidationsstatus des HSA im November 2011 bestimmt. Tabelle 3 und Abbildung 4 zeigen die Resultate dieser Messungen hinsichtlich HMA, HNA1 und HNA2.

HMA	45,2 (42,1; 54,6)
HNA1	45,6 (39,7; 52,9)
HNA2	6,9 (4,6; 10,7)

Tabelle 3

Oxidationsstatus des Serumalbumins (HMA, HNA1 und HNA2) von 27 Patienten, welche an der Universitätsklinik für Innere Medizin aufgrund einer akuten Dekompensation ihrer Leberzirrhose behandelt wurden

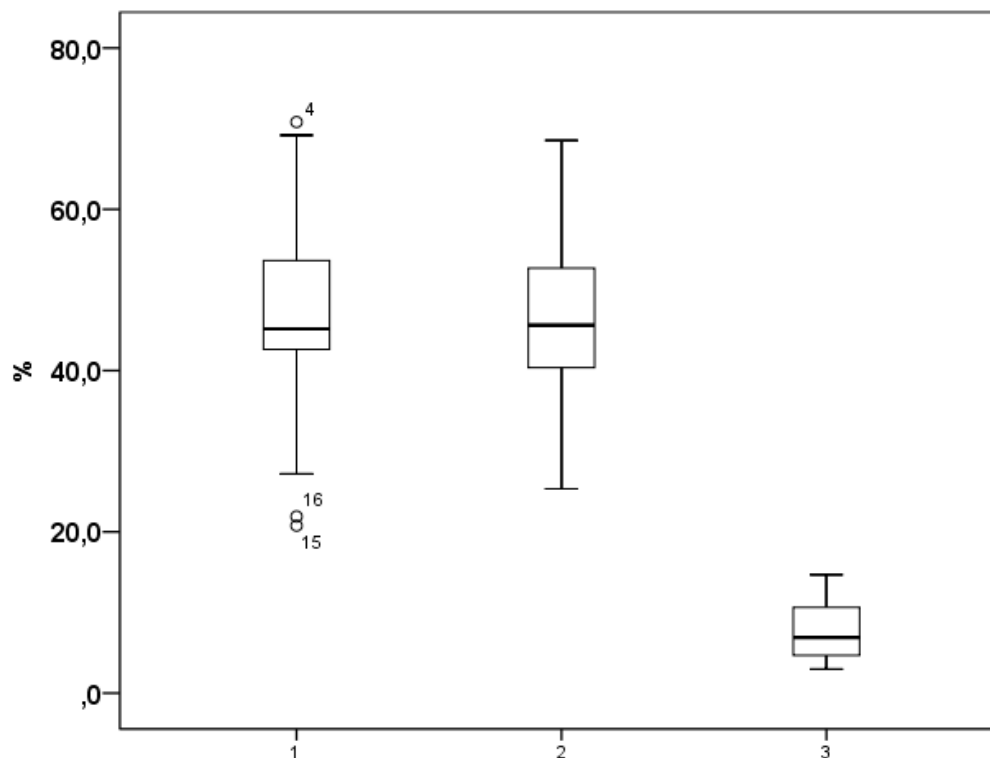


Abbildung 4

Boxplots der HMA (1), HNA1 (2) und HNA2 (3) – Werte der Patienten aus Tabelle 3

Die prognostische Wertigkeit für HMA, HNA1 und HNA2 hinsichtlich des Überlebens zu 90 und 365 Tagen wurde mittels ROC-Analyse quantifiziert und den etablierten Scores bei Leberzirrhose gegenübergestellt. Es zeigt sich in dieser Grazer Kohorte wie in bereits publizierten Arbeiten eine den hepatologischen Scores überlegene prognostische Wertigkeit des HNA2 für das Überleben zu 90d. Für das 1-Jahres Überleben sind HNA2 und MELD sowie Child-Pugh Score vergleichbar.

Abbildung 5 zeigt die ROC – Kurven, in Tabelle 4 sind die dazugehörigen AUROC – Werte und Konfidenzintervalle dargestellt.

	Überleben 90 d			Überleben 365 d		
	AUROC	CI von	CI bis	AUROC	CI von	CI bis
HMA	0,306	0,000	0,646	0,375	0,101	0,649
HNA1	0,556	0,157	0,954	0,527	0,242	0,812
HNA2	0,903	0,764	1,000	0,768	0,556	0,980
MELD	0,701	0,430	0,973	0,710	0,485	0,934
CPS	0,764	0,569	0,958	0,763	0,554	0,973

Tabelle 4

AUROC Analysen der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 sowie Child-Pugh-Score und MELD als prognostische Parameter für das Überleben zu 90 und 365 Tagen; ein Vergleich der AUROC erfolgt aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht

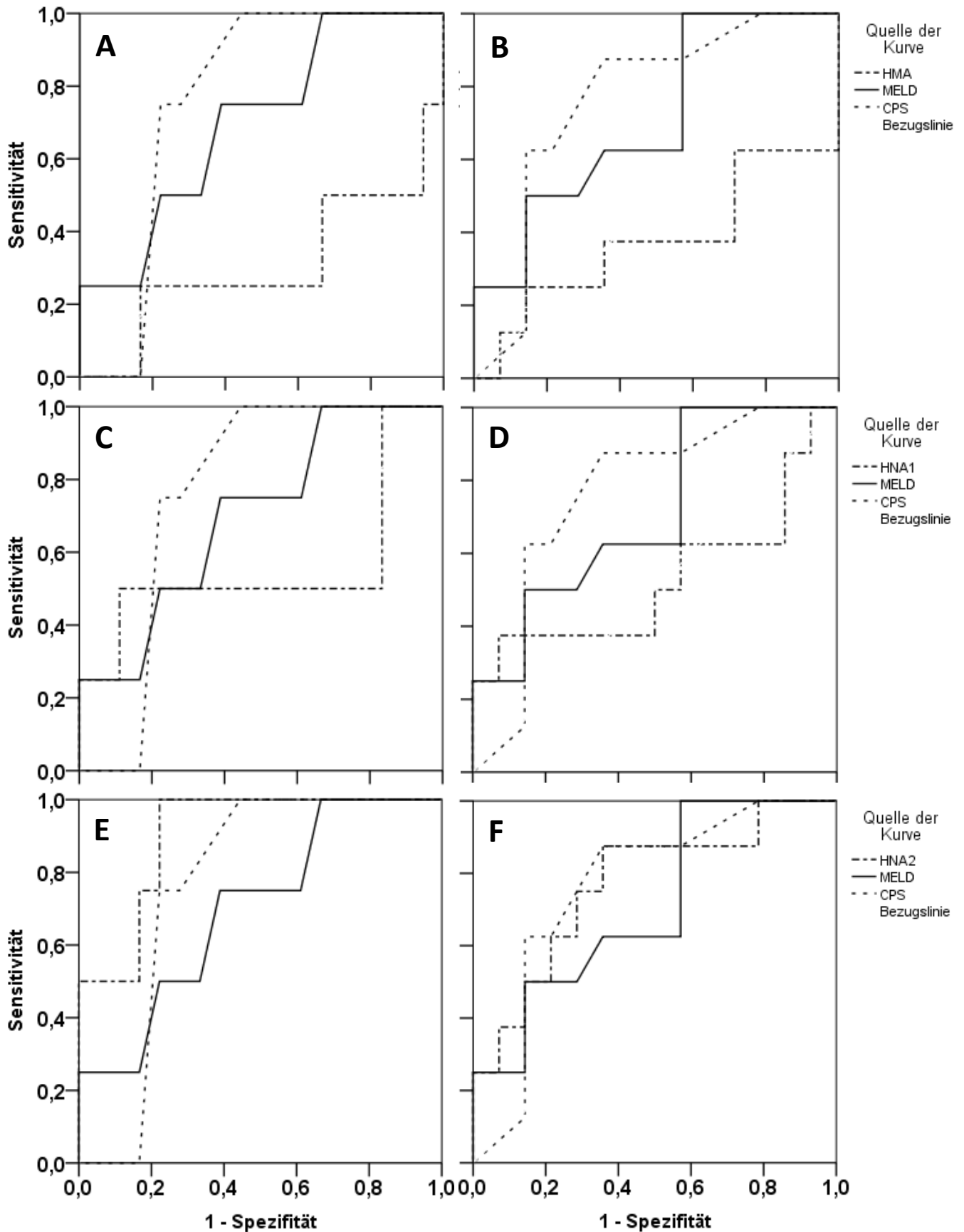


Abbildung 5

ROC – Analysen (Überleben zu 90d und 365d) für HMA (A und B), HNA1 (C und D) und HNA2 (E und F) von 27 Patienten, welche an der Universitätsklinik für Innere Medizin aufgrund einer akuten Dekompensation ihrer Leberzirrhose behandelt wurden im Vergleich zu MELD und Child-Pugh-Scores

Von den untersuchten Albuminfraktionen konnten mit HNA2 signifikante Korrelationen zu den Scores der Lebererkrankung hergestellt werden: HNA2 – CPS ($\rho=0,55$; $p=0,005$), HNA2 – MELD ($\rho=0,563$, $p=0,006$).

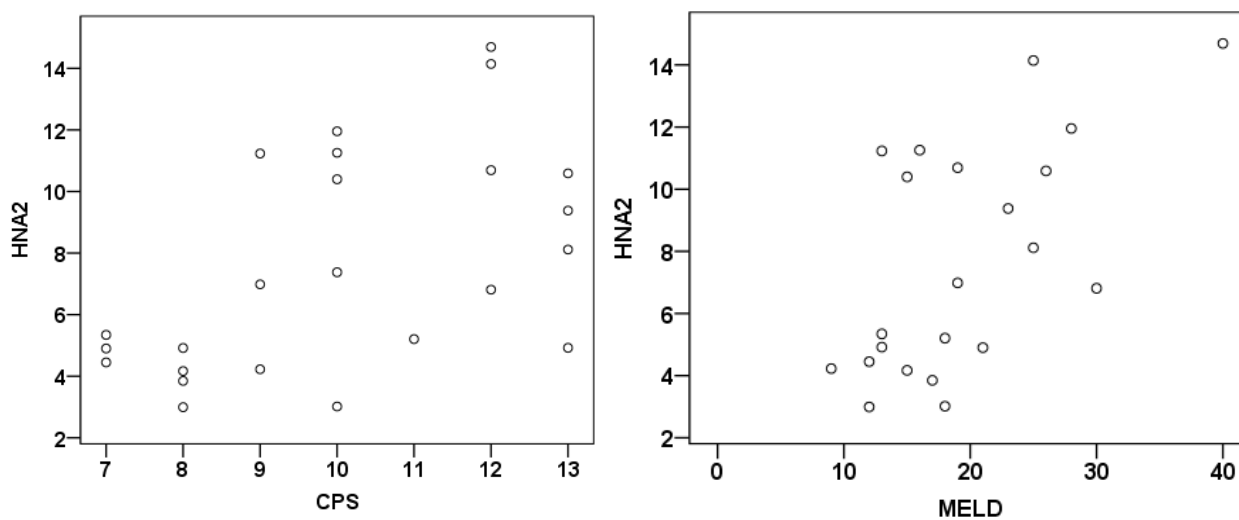


Abbildung 6
Punktdiagramme des Zusammenhanges zwischen HNA2 und Child-Pugh Score bzw. MELD Score bei 27 Patienten mit Leberzirrhose und akuter Dekompensation

3.1.2 Albuminfraktionen bei Patienten mit akuter Dekompensation einer Leberzirrhose (multinationale Kohorte)

Im Rahmen einer Substudie zur „*CLIF Acute On Chronic Liver Failure (CANONIC) Study*“, welche durch unser Zentrum zur Messung der oxidativ veränderten Albuminfraktionen beantragt wurde, wurden 376 Serumproben vermessen, von denen 333 Proben vom Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme des Patienten und somit auswertbar waren. Ziel dieser Substudie ist, die prognostische Wertigkeit des oxidierten Albumins - insbesondere HNA2 – als Biomarker für das Überleben von Patienten mit dekompensierter Lebererkrankung an einer großen Patientenkohorte zu untersuchen.

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden aufgrund der Schwere des die akute Dekompensation begleitenden Organversagens und der 28-Tage-Mortalität in ACLF - Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen sind definiert als:

- ACLF 0:
 - a) Patienten ohne Organversagen
 - b) Patienten mit einem singulären Organversagen, welches nicht die Niere betrifft
 - c) Patienten mit hepatischer Enzephalopathie und normalem Serumkreatinin
- ACLF 1:
 - a) Patienten mit alleinigem Nierenversagen
 - b) Patienten mit einem singulären Organversagen, welches nicht die Niere betrifft und Kreatinin 1,5 – 1,9 mg% sowie milder hepatischer Enzephalopathie
 - c) Patienten mit hepatischer Enzephalopathie und einem Serumkreatinin von 1,5 – 1,9 mg%
- ACLF 2: Patienten mit Zweiorganversagen
- ACLF 3: Patienten mit Dreiorganversagen

Die folgenden Ergebnisse werden teilweise aufgrund dieser Gruppeneinteilung stratifiziert dargestellt.

Alter [a]	58 (50; 65)		p*
Geschlecht (weibl)	37%		0,061
Ätiologie der Leberzirrhose [#]			
Alkohol	59%	(196/333)	<0,001
Chronische Hepatitis C	31%	(104/333)	<0,001
Chronische Hepatitis B	7%	(22/333)	-
NAFLD	4%	(14/333)	-
PBC	2%	(8/333)	-
Kryptogen	5%	(18/333)	-
Andere	5%	(18/333)	-
Ursache der ungeplanten Krankenhausaufnahme [#]			
Gastrointestinale Blutung	14%	(46/333)	0,004
Ascites	57%	(191/333)	0,008
Akutes Nierenversagen	23%	(77/333)	0,811
Infektion	21%	(71/333)	0,320
Hep. Enzephalopathie	33%	(111/333)	<0,001
ACLF Gruppenzuordnung			
ACLF 0	77%	(257/333)	n.a.
ACLF 1	10%	(33/333)	n.a.
ACLF 2	10%	(32/333)	n.a.
ACLF 3	3%	(11/333)	n.a.
Child Pugh Score [§]	10 (8; 11)		0,448
Child Pugh Klasse A	5%	(17/333)	-
Child Pugh Klasse B	34%	(112/333)	0,528
Child Pugh Klasse C	44%	(146/333)	0,159
MELD	18 (14; 24)		0,783

* vs n=27 der Grazer Kohorte; [#] Werte über 100% aufgrund mehrfacher Ätiologien/Ursachen der Zirrhose; [§] Werte unter 100% aufgrund fehlender Werte; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; PBC, Primär biliäre Cholangitis; ACLF, Acute-on-chronic liver failure; MELD, Model of End-stage Liver Disease

Tabelle 5

Daten von 333 Patienten, welche europaweit im Rahmen der CANONIC („CLIF Acute On Chronic Liver Failure Study“) Studie eingeschlossen wurden zum Zeitpunkt ihres Einschlusses. Die p-Werte stellen den Vergleich zum Grazer Patientenkollektiv (n=27) dar.

Die Proben wurden im November 2013 vom Studienzentrum (Barcelona) nach Graz versandt und im Dezember 2013 bzw. im Jänner 2014 vermessen. Folgende HMA, HNA1 und HNA2 – Werte wurden gemessen [median (Q1; Q3)]:

	Gesamt (n=333)	ACLF 0 (257)	ACLF 1 (33)	ACLF 2 (32)	ACLF 3 (11)
HMA	52,0 (41,1; 61,3)	53,2 (42,7; 61,7)	50,8 (34,4; 62,0)	47,5 (33,5; 58,4)	44,9 (31,9; 55,7)
HNA1	40,6 (32,3; 50,1)	39,9 (33,2; 48,5)	41,5 (29,5; 55,2)	44,8 (31,2; 53,4)	46,0 (18,5; 56,2)
HNA2	6,6 (3,7; 10,4)	5,4 (3,4; 9,4)	8,3 (4,9; 12,5)	10,4 (6,7; 13,0)	13,5 (7,8; 19,6)

Tabelle 6

Oxidationsstatus des HSA bei 333 Patienten, welche im Rahmen der CANONIC – Studie multizentrisch eingeschlossen wurden. Weiters ist die Aufteilung der Albuminfraktionen nach den ACLF Gruppen 0-3 unterteilt dargestellt.

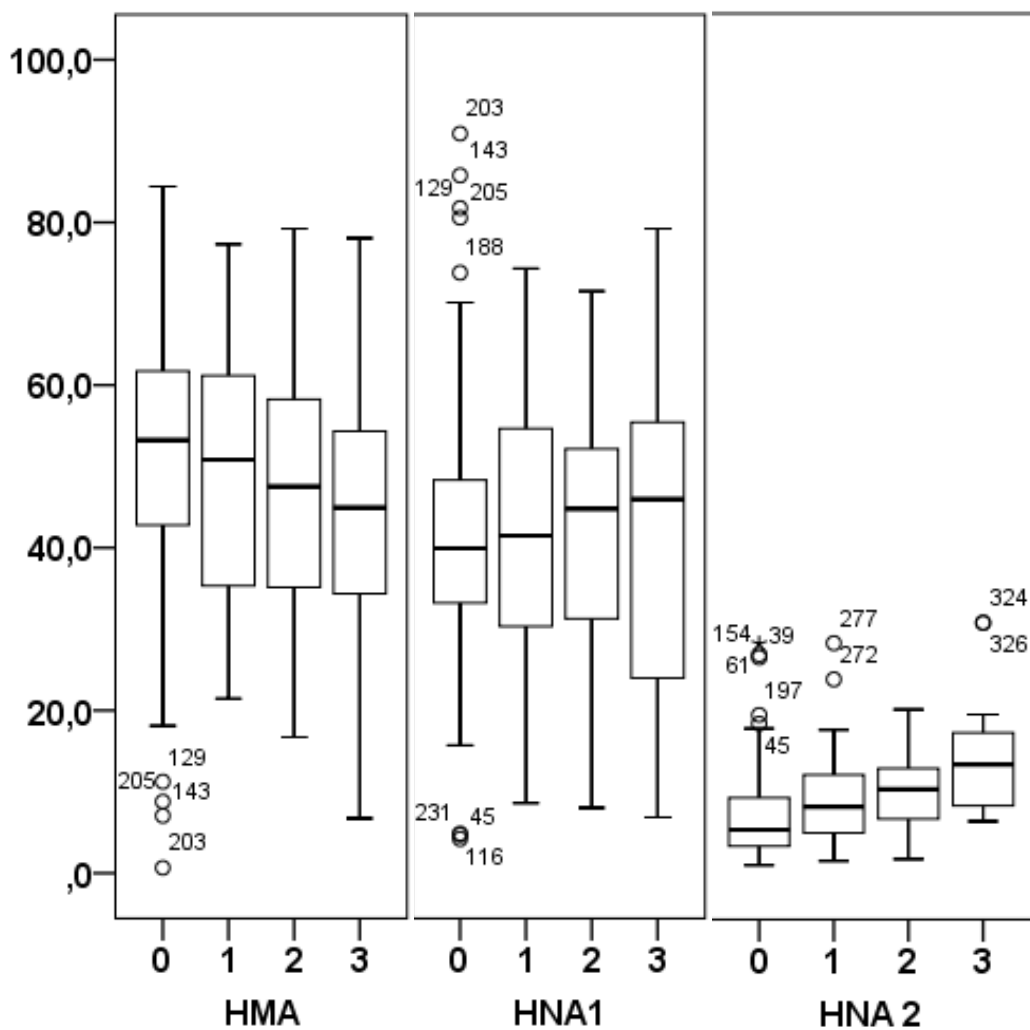


Abbildung 7

Boxplots der HMA, HNA1- und HNA2 – Werte der 333 Patienten der CANONIC – Studie gruppiert nach ACLF Gruppe (0 – 3)

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den HMA und HNA1 – Werten der verschiedenen ACLF – Gruppen ($p=0,071$ und $0,740$), jedoch stiegen die HNA2 – Werte mit zunehmender Schwere des Organversagens an ($p=0,000$). Insbesondere unterschied sich die Gruppe ACLF 0 von den ACLF - Gruppen 1 bis 3 (p jeweils $<0,05$). Zwischen den ACLF 1,2 und 3 Gruppen waren die HNA2 – Unterschiede (möglicherweise aufgrund der kleineren Gruppengrößen) weniger stark ausgeprägt (ACLF 1 vs 2: $p=0,529$; ACLF 1 vs 3: $p=0,038$; ACLF 2 vs 3: $p=0,11$).

Im Vergleich der Gesamtgruppe ($n=333$) zu den Daten der Grazer Kohorte ($n=27$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Menge der Albuminfraktionen ($p=0,085$, $0,054$ und $0,441$ für HMA, HNA1 und HNA2).

Die prognostische Wertigkeit für HMA, HNA1 und HNA2 hinsichtlich des Überlebens zu 90 und 365 Tagen wurde analog der Grazer Kohorte mittels ROC-Analyse quantifiziert und MELD sowie Child-Pugh Score gegenübergestellt. **Abbildung 8** und **Tabelle 7** zeigen die diesbezüglichen Daten der Gesamtkohorte von 333 Patienten, die Subgruppenanalysen für die Gruppen ACLF 0 – 3 sind in Tabelle 8 aufgelistet.

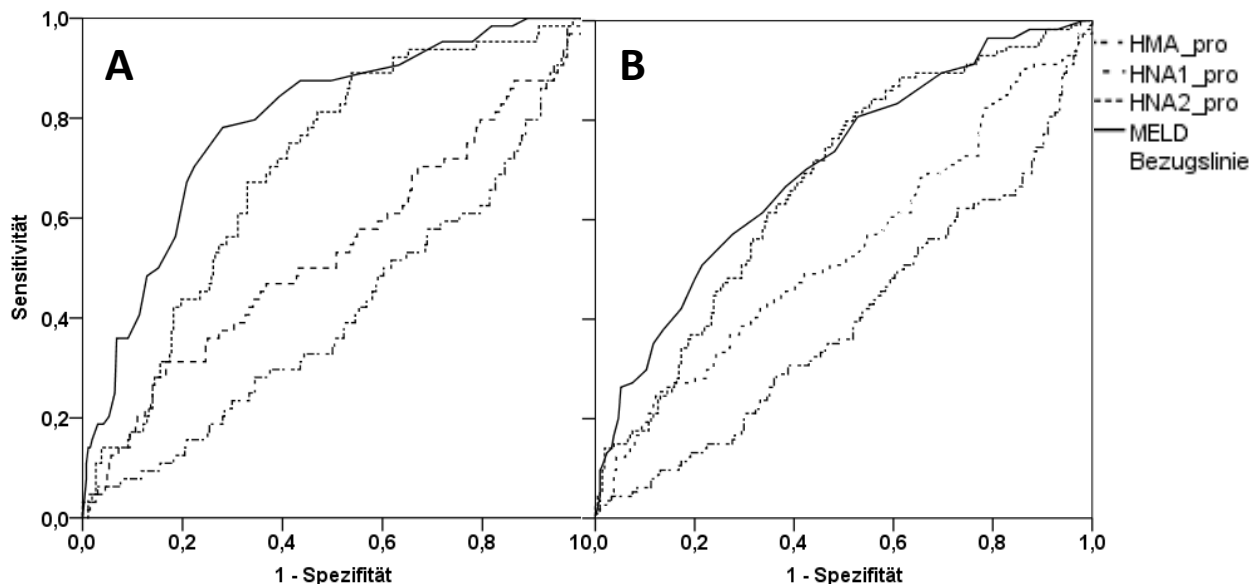


Abbildung 8

ROC – Kurven hinsichtlich Überleben zu 90 (A) und 365 (B) Tagen für HMA, HNA1 und HNA2 im Vergleich zu MELD (Anm.: Die Kurve für den Child-Pugh Score wird aufgrund der zahlreichen fehlenden Werte nicht dargestellt, AUROC in der Tabelle)

	Überleben 90 d			Überleben 365 d		
	AUROC	CI von	CI bis	AUROC	CI von	CI bis
HMA	0,406 ^{1,2}	0,326	0,487	0,401 ^{1,2}	0,335	0,466
HNA1	0,530 ^{1,2}	0,444	0,615	0,537 ^{1,2}	0,469	0,604
HNA2	0,698 ¹	0,631	0,764	0,672	0,612	0,732
MELD	0,789	0,729	0,850	0,704	0,645	0,763
CPS	0,729 ¹	0,661	0,797	0,660	0,594	0,726

Tabelle 7

AUROC Analysen der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 sowie MELD und Child-Pugh-Score als prognostische Parameter für das Überleben zu 90 und 365 Tagen bei 333 Patienten aus der CANONIC – Studie; ¹ p<0,05 im Vergleich zu MELD; ² p<0,05 im Vergleich zu HNA2

	Überleben 90 d			Überleben 365 d		
	AUROC	CI von	CI bis	AUROC	CI von	CI bis
ACLF 0 (n=257)						
HMA	0,431 ^{1,2}	0,316	0,547	0,433 ^{1,2}	0,351	0,515
HNA1	0,513 ^{1,2}	0,396	0,630	0,517 ^{1,2}	0,433	0,600
HNA2	0,742	0,665	0,818	0,678	0,607	0,749
MELD	0,747	0,657	0,838	0,658	0,585	0,731
CPS	0,724	0,624	0,825	0,635	0,553	0,716
ACLF 1-3 (n=76)[#]						
HMA	0,453	0,332	0,585	0,395	0,262	0,529
HNA1	0,522	0,390	0,654	0,567	0,432	0,702
HNA2	0,522	0,389	0,654	0,545	0,411	0,678
MELD	0,690	0,569	0,811	0,679	0,557	0,802
CPS	0,553	0,415	0,691	0,575	0,438	0,713
ACLF 1 (n=33)[#]						
HMA	0,524	0,318	0,729	0,374	0,172	0,576
HNA1	0,540	0,332	0,747	0,626	0,431	0,821
HNA2	0,361	0,171	0,551	0,430	0,227	0,633
MELD	0,623	0,414	0,832	0,581	0,383	0,780
CPS	0,566	0,353	0,779	0,510	0,291	0,728
ACLF 2 (n=32)[#]						
HMA	0,361	0,161	0,561	0,400	0,196	0,604
HNA1	0,580	0,376	0,784	0,550	0,336	0,764
HNA2	0,630	0,430	0,831	0,608	0,406	0,810
MELD	0,750	0,578	0,922	0,735	0,560	0,910

CPS	0,510	0,297	0,723	0,624	0,417	0,830
ACLF 3 (n=11) [#]						
HMA	0,533	0,142	0,924	0,500	0,015	0,985
HNA1	0,367	0,000	0,733	0,458	0,000	0,947
HNA2	0,567	0,198	0,936	0,583	0,172	0,995
MELD	0,617	0,268	0,966	0,500	0,041	0,959
CPS	0,550	0,148	0,952	0,639	0,258	1,000

Tabelle 8

AUROC Analysen der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 sowie MELD und Child-Pugh-Score als prognostische Parameter für das Überleben zu 90 und 365 Tagen in den ACLF – Gruppen 0 – 3 der *CANONIC* – Studie; ¹ p<0,05 im Vergleich zu MELD; ² p<0,05 im Vergleich zu HNA2; [#] AUROC – Vergleiche wurden aufgrund der zu geringen Gruppengröße nicht durchgeführt

Die prognostische Wertigkeit der Albuminfraktionen hinsichtlich Mortalität (90d und 365 d) zeigte sich in den Daten der *CANONIC* - Studie in der Gesamtgruppe und bei Patienten ohne ACLF gleichwertig dem MELD und Child-Pugh Score, während bei Patienten mit ACLF (jedes Schweregrades) MELD und/oder Child-Pugh Score numerisch eine bessere Vorhersagekraft hatten (statistische Signifikanz des AUROC –Unterschiedes aufgrund der Gruppengrößen nicht berechnet).

	Überleben 90 d			Überleben 365 d		
	AUROC	CI von	CI bis	AUROC	CI von	CI bis
Aufnahmegründe						
Ascites (n=187)						
HMA	0,446 ^{1,2}	0,352	0,540	0,423 ^{1,2}	0,339	0,506
HNA1	0,484 ^{1,2}	0,385	0,582	0,504 ^{1,2}	0,418	0,589
HNA2	0,684	0,604	0,763	0,673	0,595	0,750
MELD	0,771	0,695	0,847	0,687	0,610	0,764
CPS	0,643 ¹	0,550	0,736	0,601 ¹	0,514	0,689
HE (n=107)						
HMA	0,418 ¹	0,295	0,540	0,382 ¹	0,270	0,494
HNA1	0,528 ¹	0,393	0,664	0,553 ¹	0,435	0,670
HNA2	0,655 ¹	0,537	0,773	0,691	0,588	0,794
MELD	0,808	0,724	0,892	0,725	0,626	0,823
CPS	0,668 ¹	0,547	0,789	0,644	0,530	0,758
GI-Blutung(n=46) [#]						
HMA	0,011	0,000	0,043	0,136	0,018	0,253
HNA1	0,989	0,957	1,000	0,795	0,615	0,975
HNA2	0,682	0,544	0,819	0,718	0,543	0,893
MELD	0,597	0,544	0,819	0,674	0,543	0,893
CPS	0,838	0,705	0,971	0,713	0,501	0,925
Ätiologie						
Alkohol (n=192)						
HMA	0,337 ^{1,2}	0,239	0,434	0,352 ^{1,2}	0,268	0,437
HNA1	0,599 ¹	0,490	0,707	0,568 ^{1,2}	0,479	0,656
HNA2	0,711 ¹	0,625	0,797	0,732	0,656	0,808
MELD	0,819	0,752	0,886	0,732	0,733	0,862
CPS	0,747 ¹	0,671	0,823	0,718 ¹	0,638	0,798

Tabelle 9

AUROC Analysen der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 sowie MELD und Child-Pugh-Score als prognostische Parameter für das Überleben zu 90 und 365 Tagen in jenen Subgruppen der *CANONIC* – Studie, welche sich zu Baseline signifikant von den Grazer Daten unterschieden; ¹ p<0,05 im Vergleich zu MELD; ² p<0,05 im Vergleich zu HNA2; # AUROC – Vergleiche wurden aufgrund der zu geringen Gruppengröße nicht durchgeführt

Die Verteilung der Subgruppen von Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose bzw.

Ascites, gastrointestinaler Blutung oder hepatischer Enzephalopathie als Grund der

ungeplanten Krankenhausaufnahme unterschied sich in der *CANONIC* – Studie signifikant

von der Grazer Kohorte. Es wurden daher die AUROC – Analysen für diese Subgruppen gesondert berechnet. Einzig in der Subgruppe der Patienten mit gastrointestinaler Blutung fiel ein besserer prognostischer Wert der Albuminfraktionen, im Besonderen des HNA1 auf. Einschränkend muss hier die Anzahl der Ereignisse (n=2 für 90d bzw. n=7 für 365d) erwähnt werden.

Ansonsten war die prognostische Wertigkeit anhand der AUROC – Flächen von HNA2 in diesen Subgruppen mit jener von MELD und Child-Pugh Score (zur Ein-Jahres-Mortalität) vergleichbar.

Es konnten mit HMA, HNA1 und HNA2 signifikante Korrelationen zu den Scores der Lebererkrankung hergestellt werden: HMA – CPS ($\rho = -0,30$; $p < 0,001$), HMA – MELD ($\rho = -0,32$; $p < 0,001$), HNA1 – CPS ($\rho = 0,20$; $p = 0,001$), HNA1 – MELD ($\rho = 0,19$; $p < 0,001$), HNA2 – CPS ($\rho = 0,43$; $p < 0,001$), HNA2 – MELD ($\rho = 0,52$, $p < 0,001$).

Die Korrelationen mit dem Alter waren schwach und nicht signifikant HMA – Alter ($\rho = -0,06$; $p = 0,234$), HNA1 – Alter ($\rho = 0,09$; $p = 0,092$), HNA2 – Alter ($\rho = -0,11$; $p = 0,051$).

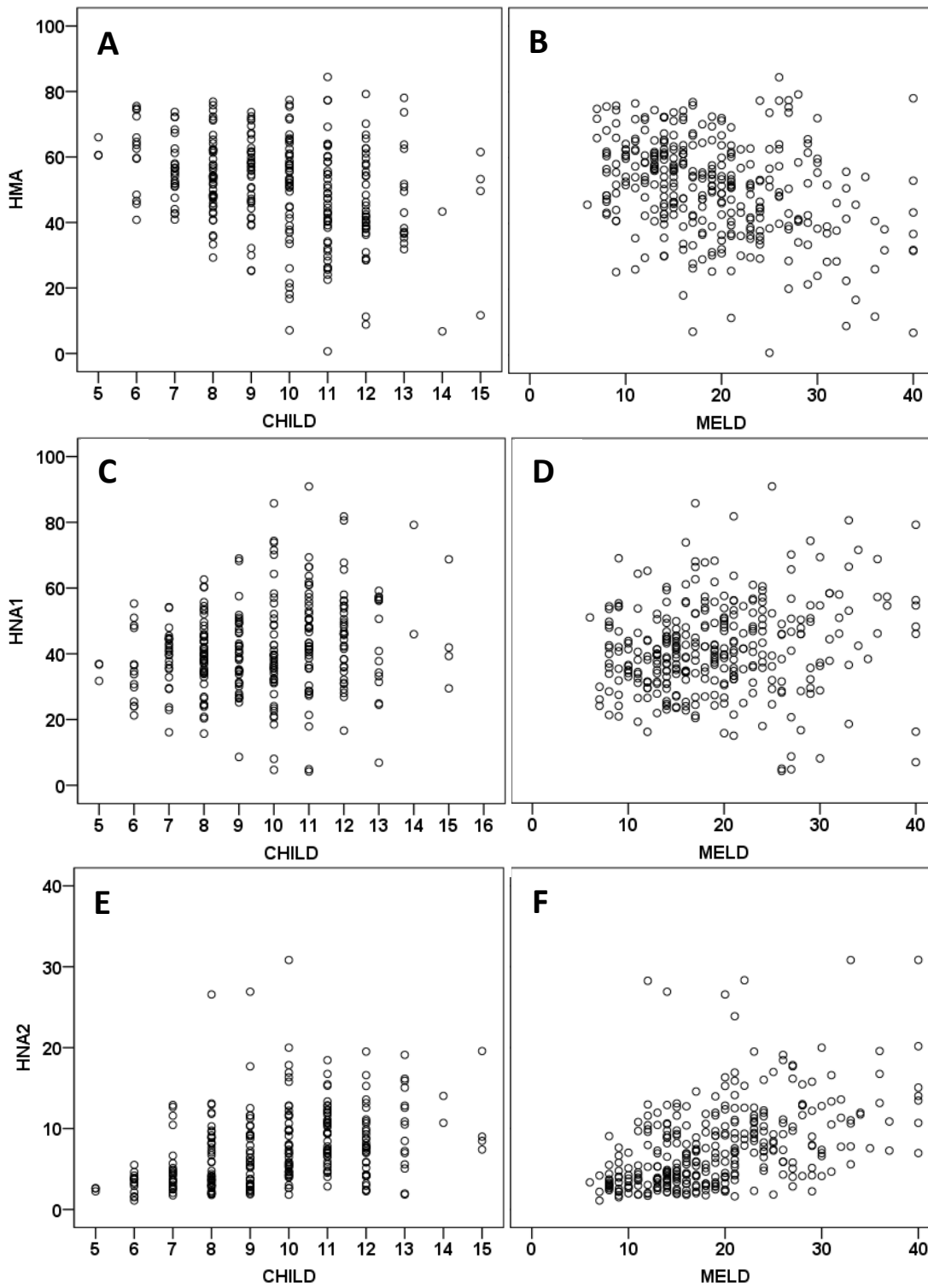


Abbildung 9
 Punktdiagramme des Zusammenhanges zwischen HMA (A,B), HNA1 (C,D) und HNA2 (E,F) und Child-Pugh Score bzw. MELD Score bei 333 Patienten der *CANONIC* - Studie

3.1.3 Vergleich der Albuminfraktionen aus gemischt venösem und Lebervenenblut

Zur Ermittlung eines möglichen Unterschiedes der oxidativ veränderten Albuminfraktionen im unmittelbaren Abstromgebiet der Leber (Sampling aus der Lebervene) und in der systemischen Zirkulation (Vena cava superior) wurden im Zeitraum 2011 – 2014 bei 27 Patienten mit Leberzirrhose Plasmapärchen im Rahmen einer Lebervenenkatheteruntersuchung gesammelt.

Alter		62 (54; 68)	
Geschlecht (weibl)		19%	
Ätiologie der Leberzirrhose			
	Chronische Hepatitis C	41%	(11/27)
	Alkohol	41%	(11/27)
	NASH	11%	(3/27)
	Chronische Hepatitis B	4%	(1/27)
	Kryptogen	4%	(1/27)
Indikation zur Lebervenenkatheteruntersuchung			
	Diagnostik portopulmonaler Hypertonie	33%	(9/27)
	Resektabilität bei HCC	19%	(5/27)
	Vorbereitung zur Lebertransplantation	15%	(4/27)
	Diagnostik portaler Hypertonus	15%	(4/27)
	Betablockertherapie	11%	(3/27)
	Indikationsstellung zur antiviralen Therapie	7%	(2/27)
Child Pugh Score		6 (5; 8)	
	Child Pugh Klasse A	56%	(15/27)
	Child Pugh Klasse B	37%	(10/27)
	Child Pugh Klasse C	7%	(2/27)
MELD		10 (9; 13)	

NASH, Nichtalkoholische Steatohepatitis; HCC, Hepatozelluläres Karzinom; MELD, model of end stage liver disease

Tabelle 10

Klinische Charakteristika von 27 Patienten, bei denen Plasmapaare aus peripher venösem und Lebervenenblut hinsichtlich eines Unterschiedes der oxidativ veränderten Albuminfraktionen vermessen wurden

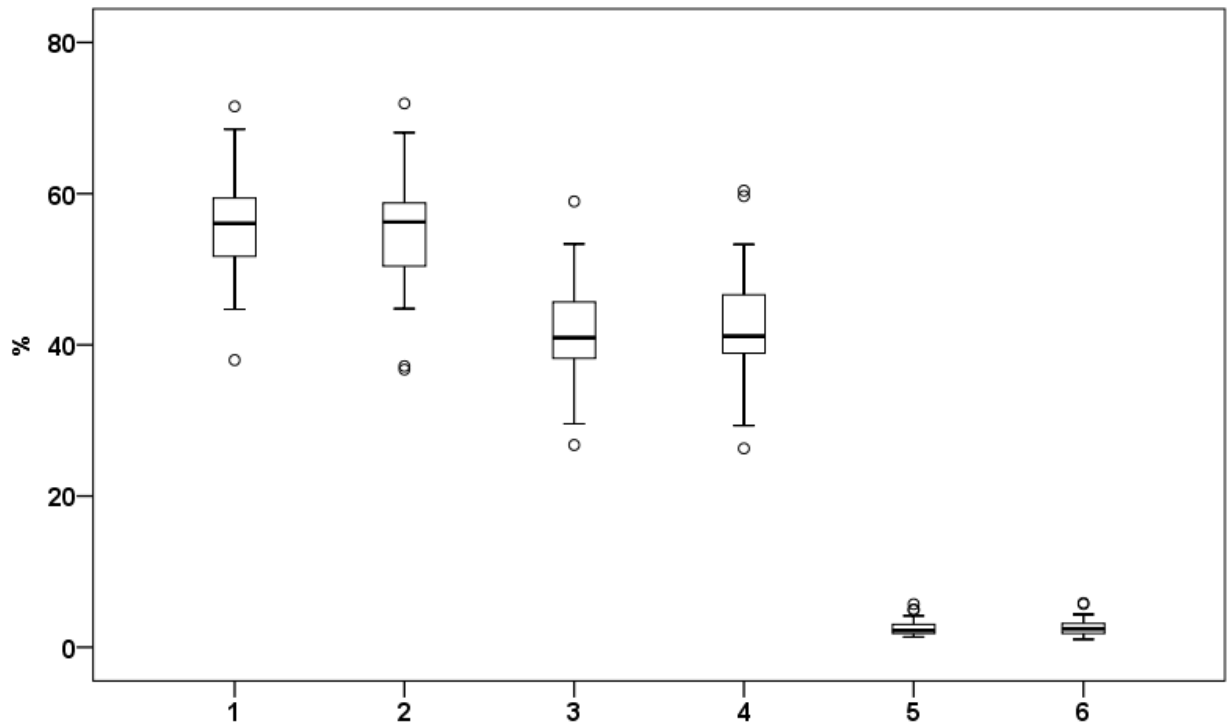


Abbildung 10

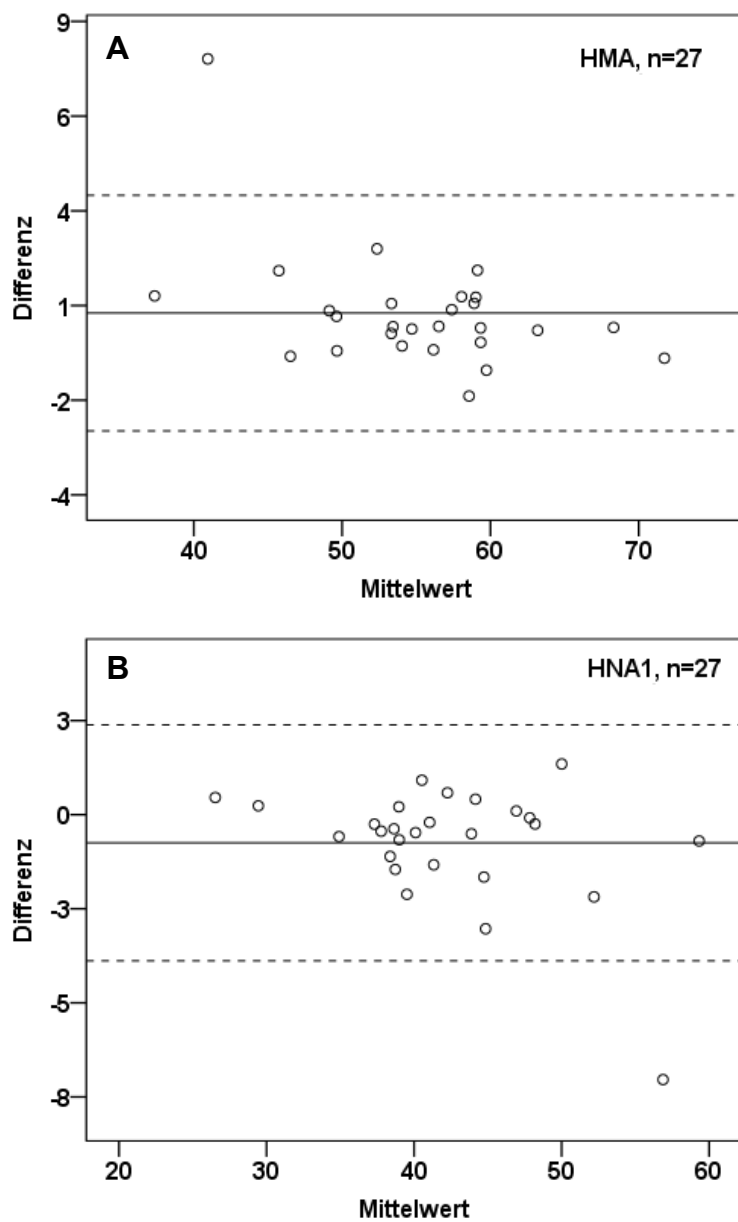
Boxplots der prozentualen Messwerte aus Blut der Vena cava superior für HMA (1), HNA1 (3) und HNA2 (5) sowie Blut der Lebervene - HMA (2), HNA1 (4) und HNA2 (6)

	HMA	HNA1	HNA2
A			
Deskriptive Statistik LV			
Mittelwert	54,6	42,7	2,7
Median	56,2	41,1	2,4
Standardabweichung	7,8	7,6	1,2
Q1	49,7	38,9	1,8
Q3	59,1	46,9	3,3
Deskriptive Statistik VCS			
Mittelwert	55,0	42,4	2,6
Median	56,2	41,0	2,3
Standardabweichung	7,4	7,2	1,2
Q1	49,9	38,5	1,8
Q3	59,3	46,9	3,0
B			
Bland Altman Auswertung			
Mittelwert	0,8	-0,8	-0,1
Standardabweichung	1,6	1,6	0,6
Untergrenze CI	-2,3	-3,9	-1,3
Obergrenze CI	3,9	2,4	1,2
p*	0,014	0,022	0,663

* t-Test gegen 0; LV, Lebervene; VCS, vena cava superior; HMA, Humanes Mercaptalbumin; HNA1/2, Humanes Nonmercaptalbumin 1/2; Q1, 1.Quartile=25.Perzentile; Q3, 3.Quartile=75.Perzentile; CI, Konfidenzintervall

Tabelle 11

Deskriptive Daten (A) sowie Ergebnis der Bland-Altman-Auswertung (B) der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 aus Plasmapärchen gemessen aus Lebervenenblut und venösem Blut der Vena cava superior (VCS)



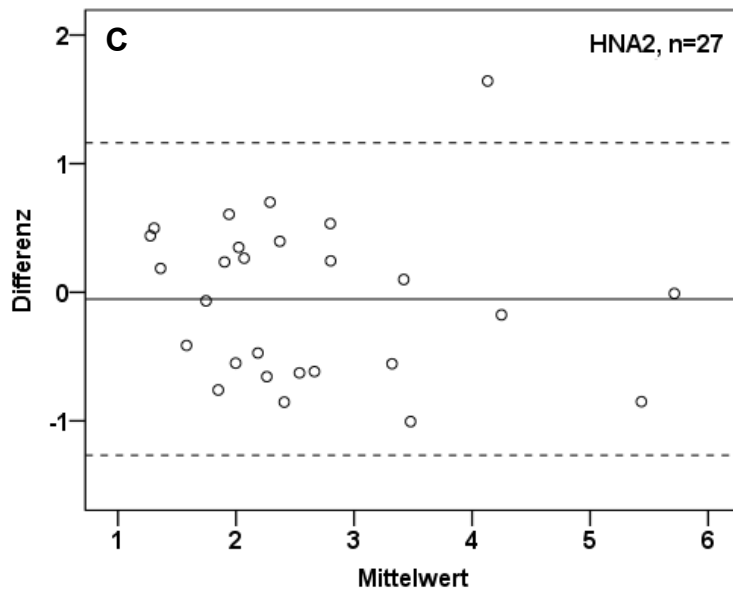


Abbildung 11

Bland-Altman Diagramme für HMA (A), HNA1 (B) und HNA2 (C) zum Vergleich der Messwerte aus VCS und Lebervenenblut. Die durchgehende Linie repräsentiert den Mittelwert der Differenzen, der Bereich zwischen den gestrichelten Linien den 95% - Bereich

Es zeigen sich vergleichbare Messwerte in Abhängigkeit des Entnahmeortes. Anhand der durchgeführten Analysen nach Bland und Altman zeigen sich signifikante Unterschiede (und somit formal eine systematische Abweichung) der Messwerte nach Entnahmeort bei HMA und HNA1. Diese Abweichung ist jedoch gering und befindet sich bei je 0,8%. Für HNA2 zeigt sich keine systematische Abweichung zwischen der Messung aus der Lebervene und dem gemischtvenösen Blut.

3.2 Methodenvergleich der Höhen- und Flächenmessung der Albuminfraktionen

3.2.1 Gesamtdaten

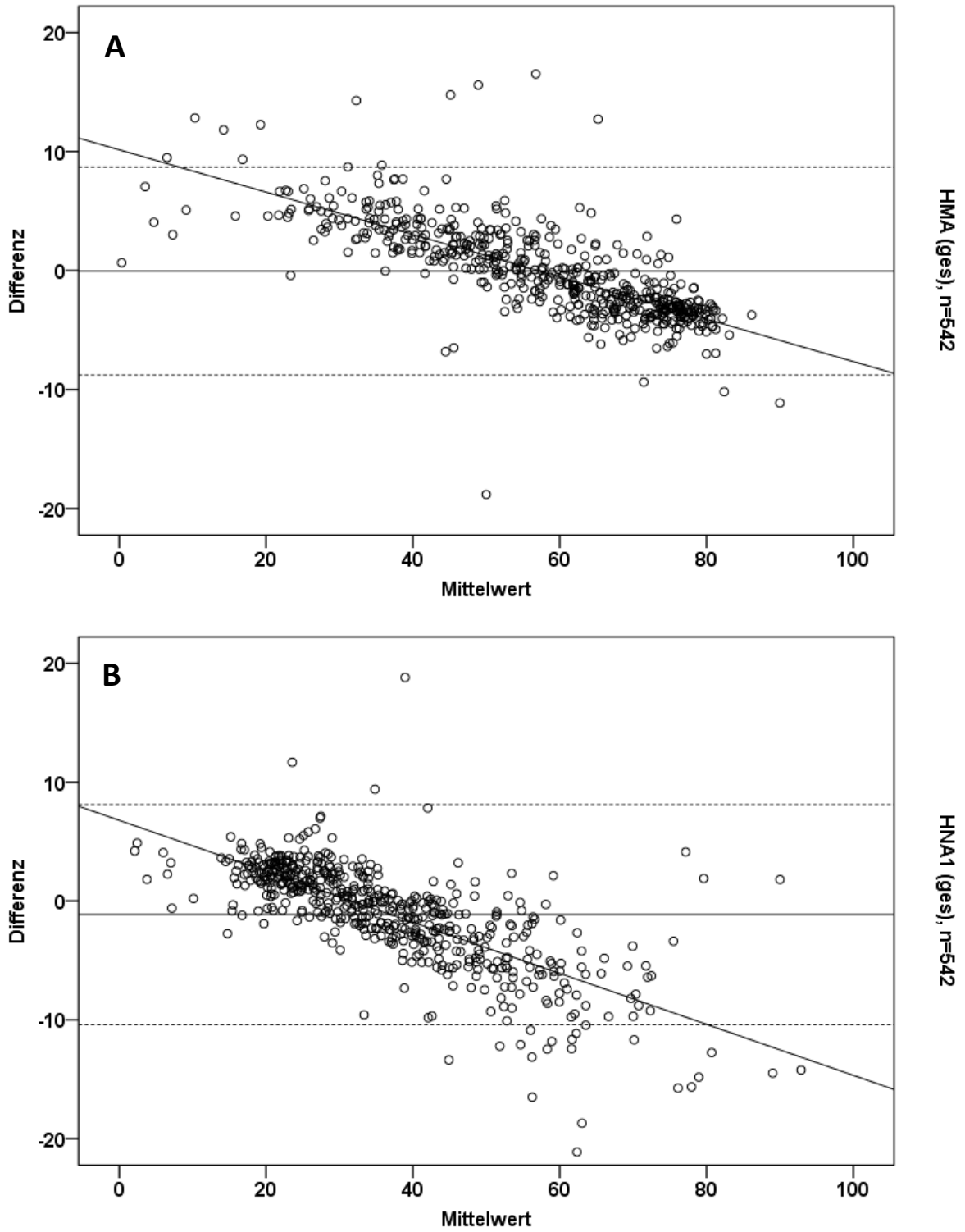
Zum Vergleich der Auswertungsmethoden „peak-Höhe“ vs. „peak-Fläche“ wurden 542 Messpaare, davon 406 von Patienten mit Leberzirrhose und 136 von Patienten ohne Leberzirrhose, zunächst im Gesamten analysiert. Tabelle 12 stellt die deskriptive Statistik der prozentuellen Verteilung der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 (sowohl mit „peak-Höhe“ als auch mit „peak-fit“), sowie den Vergleich der Auswertemethoden, dargestellt als Charakteristika des Diagrammes nach Bland und Altman, dar.

	HMA	HNA1	HNA2
A			
Deskriptive Statistik Höhe			
Mittelwert	57,3	36,4	6,4
Median	60,0	34,5	4,3
Standardabweichung	15,5	13,7	5,0
Q1	46,6	25,7	2,7
Q3	70,8	45,2	9,1
Deskriptive Statistik Fläche			
Mittelwert	57,3	37,5	5,2
Median	60,6	34,5	2,6
Standardabweichung	18,5	17,0	6,1
Q1	44,4	23,7	1,1
Q3	73,4	48,1	7,8
B			
Bland Altman Auswertung			
Mittelwert	0,0	-1,1	1,2
Standardabweichung	4,4	4,7	2,9
Untergrenze CI	-8,8	-10,4	-4,5
Obergrenze CI	8,7	8,1	6,8
p*	0,816	0,000	0,000

* t-Test gegen 0; HMA, Humanes Mercaptalbumin; HNA1/2, Humanes Nonmercaptalbumin 1/2; Q1, 1.Quartile=25.Perzentile; Q3, 3.Quartile=75.Perzentile; CI, Konfidenzintervall

Tabelle 12

Deskriptive Daten (A) sowie Ergebnis der Bland-Altman-Auswertung (B) der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 von 542 Proben, welche mittels Peakhöhen- und -flächenmethode vermessen wurden.



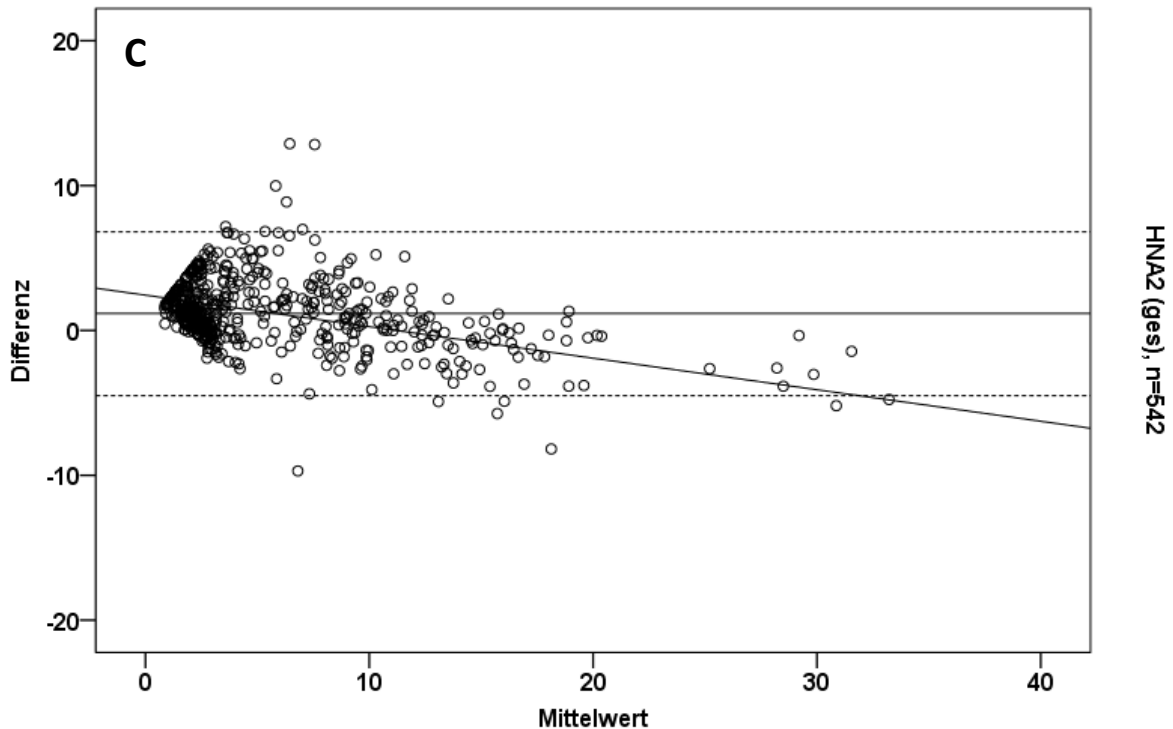


Abbildung 12

Bland-Altman Diagramme zum Methodenvergleich der Quantifizierung der Albuminfraktionen zwischen Peakhöhe und Peakfläche an 542 Patienten. HMA (A), HNA1 (B) und HNA2 (C). Die horizontal durchgehende Linie repräsentiert den Mittelwert der Differenzen, der Bereich zwischen den gestrichelten Linien den 95% - Bereich. Zudem ist die Trendlinie der Differenzen in Abhängigkeit der Messhöhe eingezeichnet.

Abbildung 12 A-C stellt Bland-Altman-Diagramme des Methodenvergleiches für HMA, HNA1 und HNA2 dar. Es zeigt sich für die Gesamtheit der Patienten keine systematische Abweichung der Ergebnisse der HMA-Werte ($p=0,816$), jedoch eine systematische Unterschätzung der HNA1-Werte durch Höhenmessung um 1,1% ($p<0,001$) und korrespondierend dazu eine systematische Überschätzung der HNA2-Werte durch Höhenmessung um 1,2% ($p<0,001$).

Während aufgrund der höheren Absolutwerte die prozentuellen Messabweichungen in bei HMA und HNA1 nicht vorhanden bis gering (HNA1: $\sim 3\%$, 1,1/37,5) sind, ist die Abweichung bei HNA2 beträchtlich (23%, 1,2/5,2).

3.2.2 Patienten mit Leberzirrhose, n=406

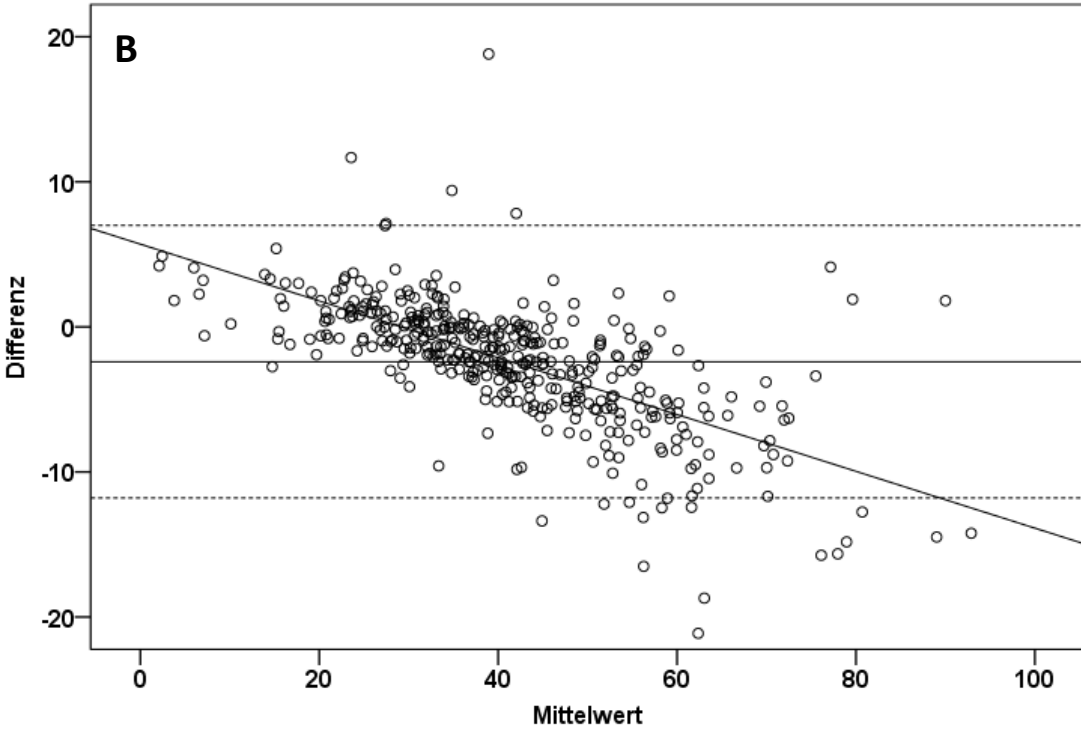
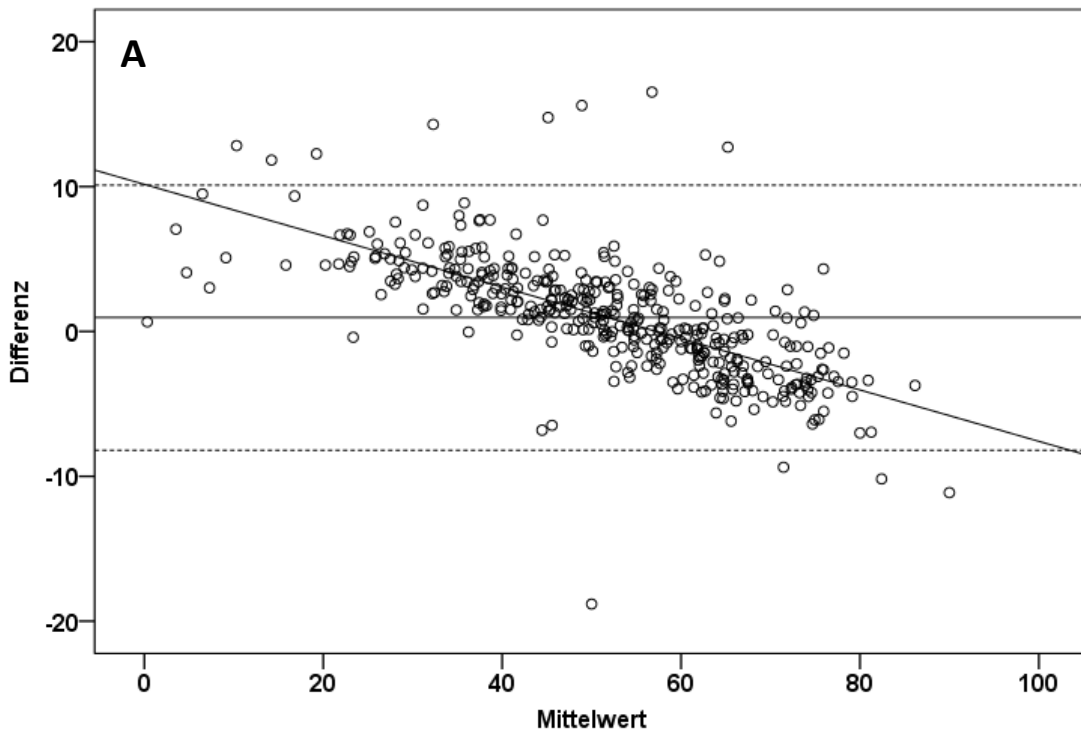
Tabelle 13 zeigt die deskriptive Statistik und die Charakteristika des Diagrammes nach Bland und Altman für die Subgruppe der Patienten mit Leberzirrhose (406 Messpaare). Die korrespondierenden Bland-Altman-Diagramme für HMA, HNA1 und HNA2 sind in den Abbildung 13 A-C dargestellt.

		HMA	HNA1	HNA2
A				
Deskriptive Statistik Höhe				
	Mittelwert	52,3	40,1	7,6
	Median	53,3	39,1	6,5
	Standardabweichung	14,6	13,7	5,1
	Q1	42,3	31,3	3,7
	Q3	62,8	48,6	10,5
Deskriptive Statistik Fläche				
	Mittelwert	51,3	42,5	6,2
	Median	51,9	41,5	3,7
	Standardabweichung	17,4	16,6	6,7
	Q1	38,9	30,9	0,9
	Q3	64,5	53,5	9,5
B				
Bland Altman Auswertung				
	Differenz-Mittelwert	1,0	-2,4	1,4
	Differenz-Stdw	4,7	4,8	3,2
	Untergrenze CI	-8,2	-11,8	-4,9
	Obergrenze CI	10,1	7,0	7,8
	p*	0,000	0,000	0,000

* t-Test gegen 0; HMA, Humanes Mercaptalbumin; HNA1/2, Humanes Nonmercaptalbumin 1/2; Q1, 1.Quartile=25.Perzentile; Q3, 3.Quartile=75.Perzentile; CI, Konfidenzintervall

Tabelle 13

Deskriptive Daten (A) sowie Ergebnis der Bland-Altman-Auswertung (B) der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 der 406 Proben von Patienten mit Leberzirrhose, welche mittels Peakhöhen- und –flächenmethode vermessen wurden.



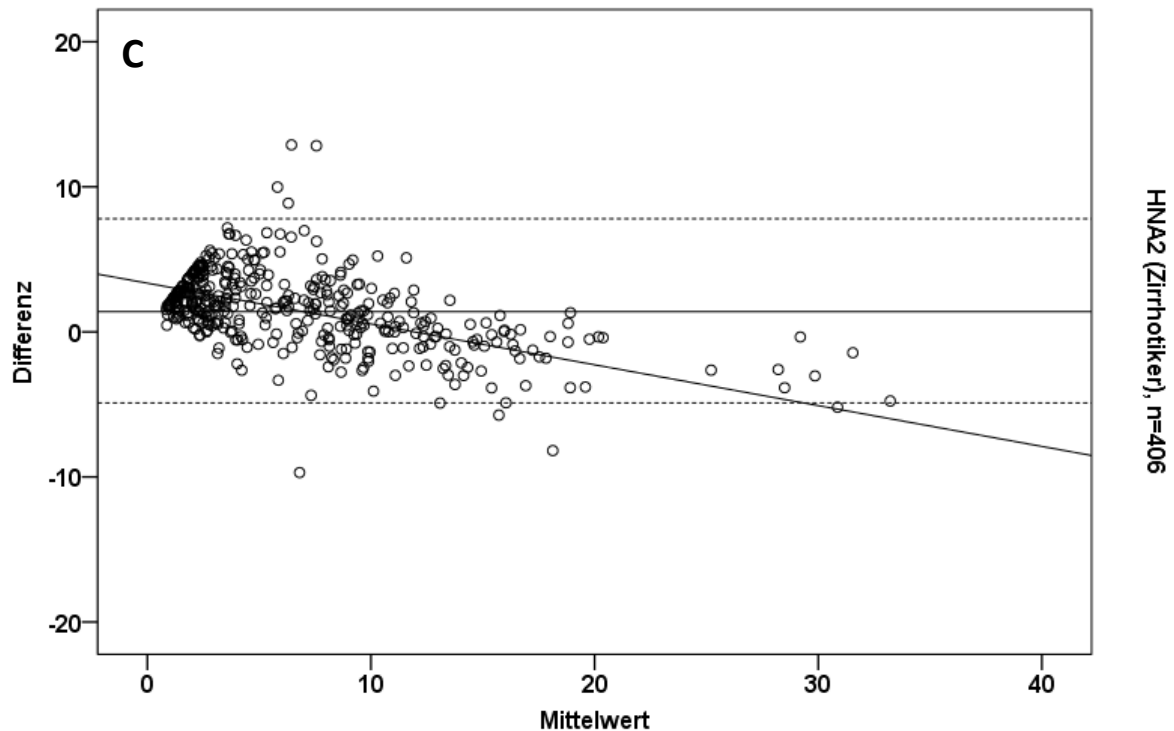


Abbildung 13

Bland-Altman Diagramme zum Methodenvergleich der Quantifizierung der Albuminfraktionen zwischen Peakhöhe und Peakfläche an 406 Zirrhotikern. HMA (A), HNA1 (B) und HNA2 (C). Die horizontal durchgehende Linie repräsentiert den Mittelwert der Differenzen, der Bereich zwischen den gestrichelten Linien den 95% - Bereich. Zudem ist die Trendlinie der Differenzen in Abhängigkeit der Messhöhe eingezeichnet

Es zeigen sich erwartungsgemäß niedrigere Werte für HMA und höhere Werte für HNA1 und HNA2 im Vergleich zur nicht-zirrhatischen Population.

Weiters stellt sich in dieser Subgruppe eine systematische Abweichung der Messung aller Albuminfraktionen dar. Mittels Messung der Peakhöhe werden HMA und HNA2 überschätzt (1,0% bzw. 1,4%, p jeweils 0,001) und HNA1 systematisch unterschätzt (2,4%, $p < 0,001$).

Die prozentuelle Abweichung der Mittelwerte zwischen Flächen- und Höhenmessung beträgt in dieser Gruppe von Patienten mit Leberzirrhose für HMA, HNA1 und HNA2 rund 2% (1/51,3), 5-6% (2,4/42,5) und 23% (1,4/6,2).

3.2.3 Patienten ohne Leberzirrhose, n=136

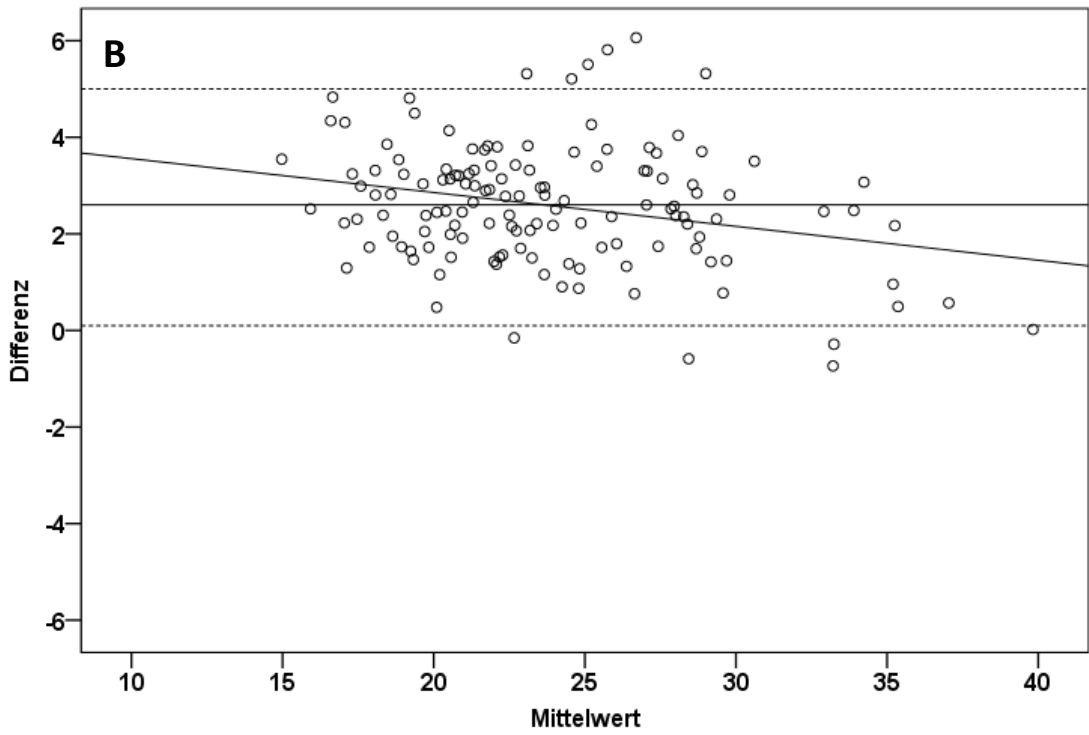
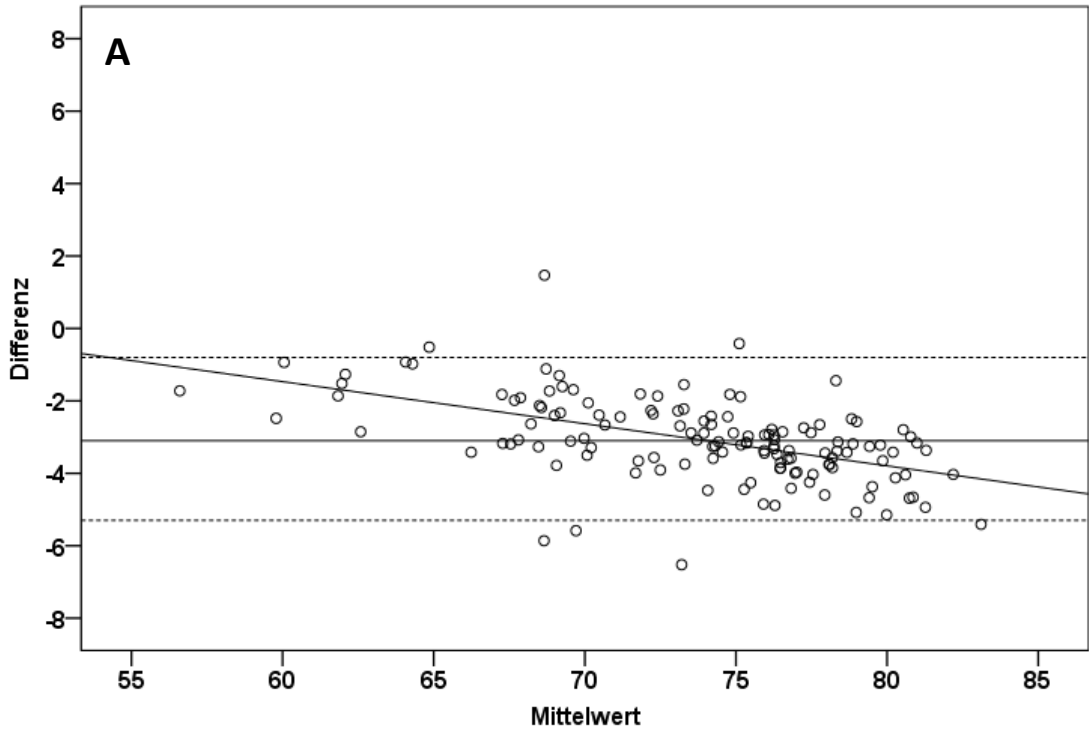
Tabelle 14 stellt die deskriptive Statistik und die Charakteristika des Diagrammes nach Bland und Altman für die Subgruppe der Patienten ohne Leberzirrhose (136 Messpaare) dar. Es wurden hier ausschließlich Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion untersucht. Abbildung 14 A-C zeigt die Bland-Altman-Diagramme für HMA, HNA1 und HNA2 in dieser Population.

	HMA	HNA1	HNA2
A			
Deskriptive Statistik Höhe			
Mittelwert	72,2	25,1	2,6
Median	73,4	24,1	2,5
Standardabweichung	4,9	4,7	0,7
Q1	68,6	21,7	2,3
Q3	75,8	28,6	2,8
Deskriptive Statistik Fläche			
Mittelwert	75,3	22,5	2,1
Median	76,3	21,5	2,0
Standardabweichung	5,5	5,0	1,0
Q1	71,6	19,1	1,4
Q3	79,1	25,7	2,9
B			
Bland Altman Auswertung			
Differenz-Mittelwert	-3,1	2,6	0,5
Differenz-Standardabweichung	1,2	1,3	1,0
Untergrenze CI	-5,3	0,1	-1,5
Obergrenze CI	-0,8	5,0	2,5
p*	0,000	0,000	0,000

* t-Test gegen 0; HMA, Humanes Mercaptalbumin; HNA1/2, Humanes Nonmercaptalbumin 1/2; Q1, 1.Quartile=25.Perzentile; Q3, 3.Quartile=75.Perzentile; CI, Konfidenzintervall

Tabelle 14

Deskriptive Daten (A) sowie Ergebnis der Bland-Altman-Auswertung (B) der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 der 136 Proben von Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose, welche mittels Peakhöhen- und –flächenmethode vermessen wurden.



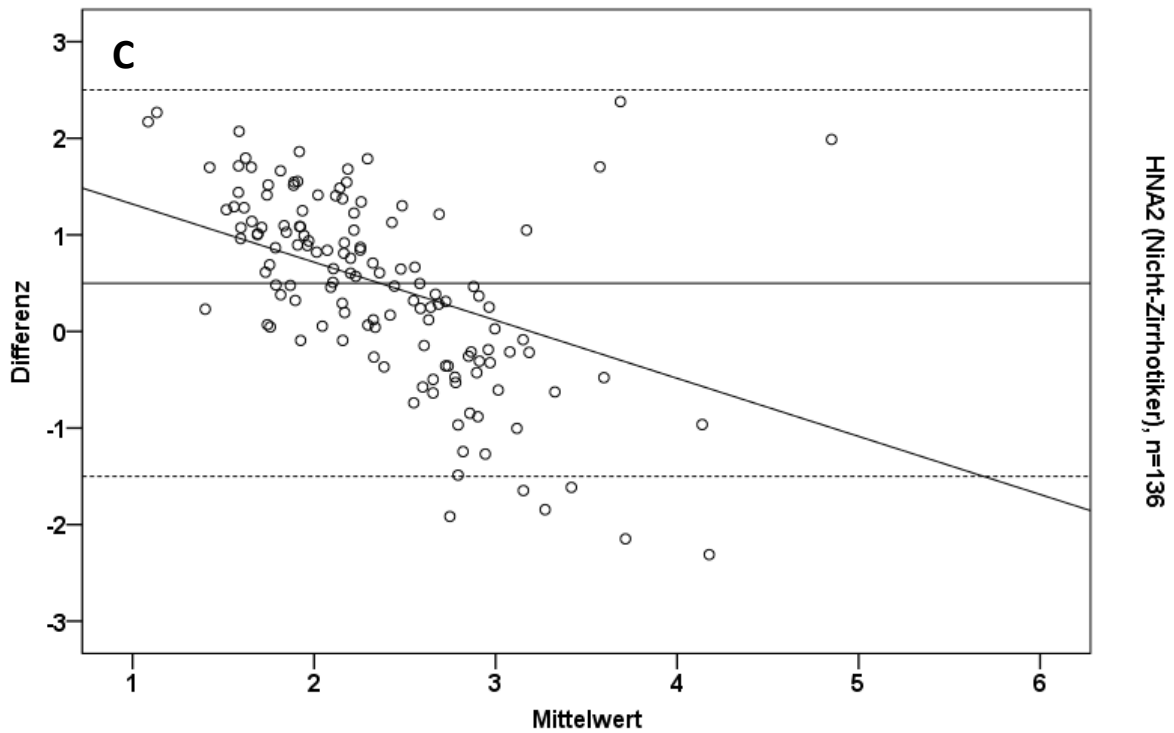


Abbildung 14

Bland-Altman Diagramme zum Methodenvergleich der Quantifizierung der Albuminfraktionen zwischen Peakhöhe und Peakfläche an 136 Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose. HMA (A), HNA1 (B) und HNA2 (C). Die horizontal durchgehende Linie repräsentiert den Mittelwert der Differenzen, der Bereich zwischen den gestrichelten Linien den 95% - Bereich. Zudem ist die Trendlinie der Differenzen in Abhängigkeit der Messhöhe eingezeichnet

Es zeigen sich mit rund 70-80% HMA und rund 25% HNA1 Werte wie in der Normalbevölkerung (siehe Einleitung), die Menge an HNA2 ist gering und liegt im Mittel zwischen 2 und 3%.

Wie in der Subgruppe der Patienten mit Leberzirrhose zeigen sich auch hier systematische Messabweichungen zwischen der Höhen- und der Flächenauswertung. Während die Auswertung über die Peakhöhe HMA unterschätzt (3,1%, $p=0,001$), werden die oxidierten Albuminfraktionen überschätzt (HNA1: 2,6%, HNA2: 0,5%; p für beide Vergleiche $<0,001$). Die prozentuelle Abweichung der Mittelwerte zwischen Flächen- und Höhenmessung beträgt für HMA, HNA1 und HNA2 rund 4% (3,1/75,3), 12% (2,6/22,5) und 24% (0,5/2,1).

3.2.4 Zusammenfassung der Auswertemethoden

Die prozentuellen Messabweichungen (Höhe vs. Fläche) in den untersuchten Subgruppen von zirrhötischen und nicht-zirrhötischen Patienten sowie in der Gesamtgruppe sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Aufgrund der relativ niedrigen Differenz bei großen Absolutwerten sind die rechnerischen Unterschiede der Mittelwerte insbesondere bei HMA gering, eine Auswertung also mit beiden Methoden vergleichbar. Die HNA1 – Messungen zeigen hinsichtlich Unter- bzw. Überschätzung durch die Bestimmung der Peakhöhe ein heterogenes Muster zwischen Zirrhötikern und nicht-zirrhötischen Patienten mit einer etwas größeren prozentuellen Mittelwertabweichung als bei HMA. Möglicherweise widerspiegelt sich hier auch ein Effekt der kleineren Fallzahl bei Patienten ohne Leberzirrhose. Eine Überschätzung der HNA2 – Werte von 20-25% mittels Höhenmessung zeigte sich über alle Gruppen.

	n	HMA	%*	HNA1	%*	HNA2	%*
Gesamt	542	n.a.	0,0	-	2,9	+	23,1
Patienten mit LZ	406	+	1,9	-	5,6	+	22,6
Patienten ohne LZ	136	-	4,1	+	11,6	+	23,8

LZ, Leberzirrhose; +, Überschätzung; -, Unterschätzung; * prozentuelle Abweichung anhand der Mittelwerte und der Differenz zwischen Flächen- und Höhenmessung; n.a., nicht zutreffend

Tabelle 15
Messabweichung durch Peakhöhenmessung im Vergleich zur Flächenmessung

3.3 Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

Es wurden insgesamt 70 Patienten mit chronischer Hepatitis C (CHC) zur Untersuchung der Neutrophilenfunktion und des Oxidationsstatus des HSA zur Klärung eines möglichen Zusammenhanges eingeschlossen. Die größere Subgruppe wurde von Patienten ohne Leberzirrhose (CHC-oZ, n=51) gebildet, wogegen bei 19 Patienten bereits eine durch die CHC verursachte Leberzirrhose vorlag (CHC-mZ). Patienten mit Leberzirrhose gemischter Ätiologien (zB CHC und Alkoholabusus) wurden nicht eingeschlossen. In Tabelle 16 sind die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie die Verteilung der CHC Genotypen zusammengefasst:

	Gesamt (n=70)	Zirrhose (n=19)	ohne Zirrhose (n=51)	p
Alter	49 (38; 59)	59 (51;64)	46 (36; 53)	0,000
Geschlecht (w)	38%	50%	33%	0,193
Zirrhose	28%	100%	0%	-
CHC Genotyp				0,527
1a	28%	30%	27%	
1b	41%	55%	35%	
1-	11%	5%	14%	
2a	1%	-	2%	
3a	13%	10%	14%	
3d	1%	-	2%	
4a	1%	-	2%	
4e	1%	-	2%	
4-	1%	-	2%	

Tabelle 16

Alters- und Geschlechtsverteilung sowie Verteilung der CHC – Genotypen bei 70 Patienten mit CHC gesamt sowie getrennt nach Zirrhose – Status; CHC, chronische Hepatitis C

In die Studie eingeschlossene Patienten mit Leberzirrhose waren signifikant älter, zeigten jedoch hinsichtlich der Verteilung der CHC – Genotypen keine zur nicht-zirrhosischen Gruppe unterschiedliche Verteilung. Häufigster Genotyp war mit 80% der Patienten (Zirrhose: 90%, ohne Zirrhose: 76%) der Genotyp 1 mit seinen Sub-Genotypen. Alle

Patienten mit Leberzirrhose befanden sich zu Studieneinschluss im kompensierten Stadium Child-Pugh A mit 5 oder 6 Punkten.

3.3.1 Albuminfraktionen bei Patienten mit Chronischer Hepatitis C

		n	HMA	HNA1	HNA2
CHC Gesamt	(CHC)	70	71,3 (66,8; 74,8)	26,0 (22,6; 30,3)	2,6 (2,3; 2,9)
CHC ohne Zirrhose	(CHC-oZ)	51	73,5 (69,3; 75,6)	24,2 (21,9; 28,3)	2,5 (2,3; 2,7)
CHC mit Zirrhose	(CHC-mZ)	19	64,4 (62,9; 69,3)	32,6 (27,0; 34,0)	3,3 (2,9; 4,1)
Gesunde Kontrollen	(Ctrl)	20	75,1 (74,1; 78,2)	22,0 (19,7; 23,6)	2,4 (2,2; 2,9)
Signifikanzen:					
p (CHC vs Ctrl)			0,000	0,000	0,000
p (CHC-mZ vs Ctrl)			0,000	0,000	0,000
p (CHC-oZ vs Ctrl)			0,006	0,004	0,586
p (CHC-oZ vs CHC-mZ)			0,000	0,000	0,000

Tabelle 17

Albuminfraktionen von 70 Patienten mit chronischer Hepatitis C (CHC) mit und ohne Leberzirrhose (CHC-mZ bzw. CHC-oZ) vor Beginn einer antiviralen Therapie im Vergleich zu 20 gesunden Kontrollen (Ctrl)

HMA, Humanes Mercaptalbumin; HNA, Humanes Nonmercaptalbumin (1 und 2)

Es zeigten sich hinsichtlich der oxidativen Veränderung des HSA zwischen den Patientengruppen und gesunden Kontrollen signifikante Unterschiede. Während der Anteil des reduzierten HMA bei Patienten niedriger war als bei Kontrollen (CHC-mZ zudem niedriger als CHC-oZ), zeigten sich erwartungsgemäß bei Patienten höhere HNA1 – Anteile als bei Kontrollen (alle Vergleiche signifikant). Zwischen den Patientengruppen bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Sinne höherer HNA1 – Anteile bei Zirrhotikern (CHC-mZ).

Auch bei HNA2 zeigten Patienten gering, jedoch signifikant höhere Werte als Kontrollen. Dies war auf den Einfluss des deutlich höheren HNA2 bei den (kompensiert) zirrhatischen Patienten zurückzuführen, während sich HNA2 – Werte zwischen Kontrollen und CHC – Patienten ohne Leberzirrhose nicht unterschieden.

3.3.2 Neutrophilenfunktion bei Patienten mit Chronischer Hepatitis C

Phago Index

Zur Quantifizierung der Funktion neutrophiler Granulozyten wurden von den unter 3.3.1 beschriebenen Patienten mit und ohne Leberzirrhose Daten erhoben.

Es zeigte sich bei Patienten mit Hepatitis C im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikante Verminderung der mittels Phago-Index berechneten globalen Phagozytosekapazität (Median: 110% vs 77% der internen Kontrolle, $p=0,001$, siehe auch Abbildung 15 A). Bei weiterer Aufschlüsselung der Patienten nach der Schwere der Lebererkrankung (Vorliegen einer Leberzirrhose) zeigte sich weiters eine stufenweise und jeweils signifikante Abnahme der Phagozytosekapazität bei Patienten ohne Leberzirrhose im Vergleich zu Kontrollen (110% vs 86%, $p=0,025$) sowie Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu Kontrollen (110% vs 60%, $p=0,000$). Zudem unterschieden sich auch die Patientengruppen untereinander signifikant ($p=0,000$).

Diese Ergebnisse entsprechen einer Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit der humanen neutrophilen Granulozyten sowohl durch die chronische Hepatitis C – Infektion als auch durch das Vorliegen einer Leberzirrhose (siehe Abbildung 15 B).

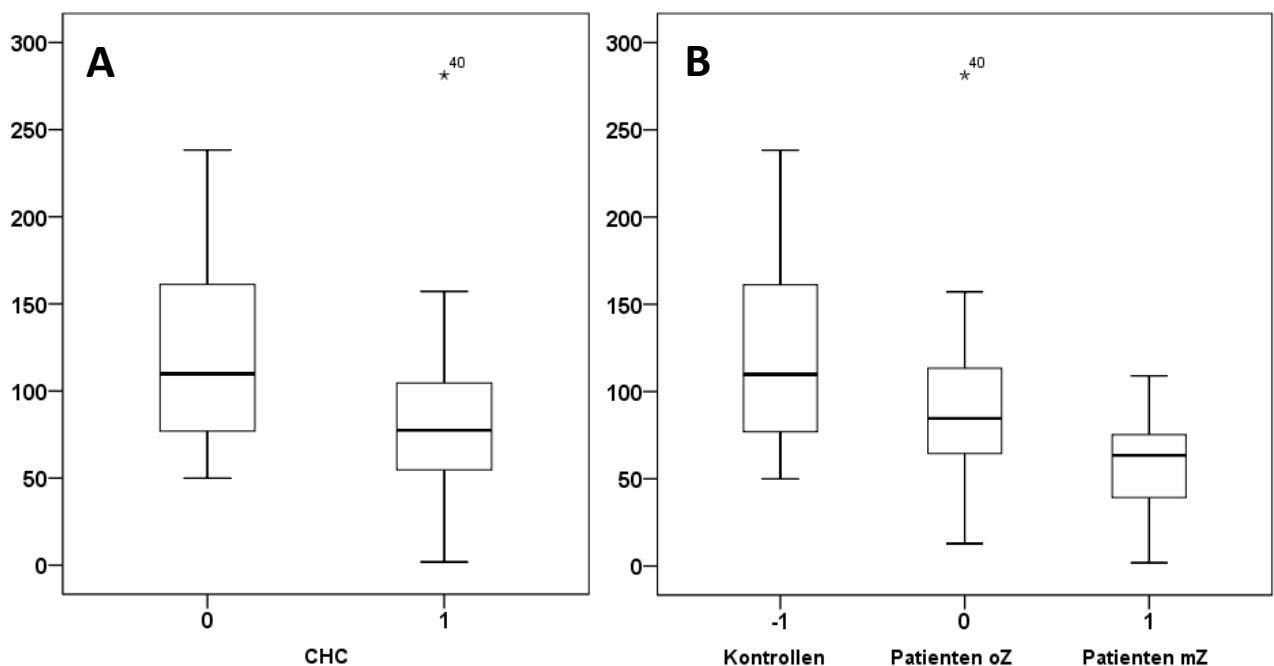


Abbildung 15

Globale Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten von 70 Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu 33 gesunden Kontrollen; A: Kontrollen (0) vs Patienten (1); B: Kontrollen (-1) vs Patienten ohne Leberzirrhose (0) vs Patienten mit Leberzirrhose (1)

Anzahl nicht phagozytierender neutrophiler Granulozyten

Die Anzahl der im Vergleich zur internen Kontrolle (=100%) nicht phagozytierenden Zellen zeigte sich bei Patienten signifikant erhöht (108% vs 183%, $p=0,008$, siehe **Abbildung 16 A**), wobei allerdings kein Unterschied innerhalb der Patientengruppen (hinsichtlich Leberzirrhose) dargestellt werden konnte (183% vs 157%, $p=0,779$, siehe **Abbildung 16 B**).

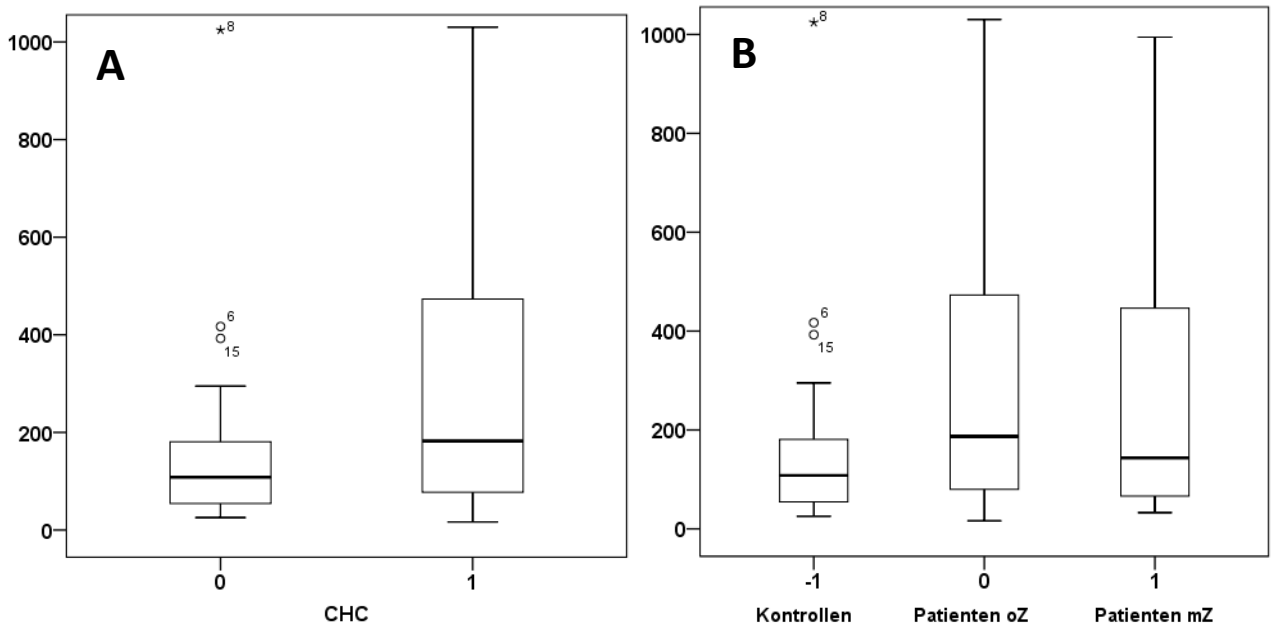


Abbildung 16

Prozentsatz nicht phagozytierender neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur internen Kontrolle von 70 Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu 33 gesunden Kontrollen; A: Kontrollen (0) vs Patienten (1); B: Kontrollen (-1) vs Patienten ohne Leberzirrhose (0) vs Patienten mit Leberzirrhose (1)

1.

Resting Burst

Der Prozentsatz neutrophiler Granulozyten, welche ohne Stimulus reaktive Sauerstoffradikale ausschütten, unterschied sich zwischen Kontrollen und Patienten signifikant (2,8% vs 2,3%, $p=0,002$, siehe Abbildung 17 A), wobei in der Patientengruppe dieser Prozentsatz geringer war. Der Unterschied ist auf einen signifikant niedrigeren Prozentsatz unter den Patienten mit Chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose zurückzuführen (2,8% vs 2,2%, $p=0,001$), während sich in den übrigen Vergleichen keine Signifikanzen zeigten (Abbildung 17 B).

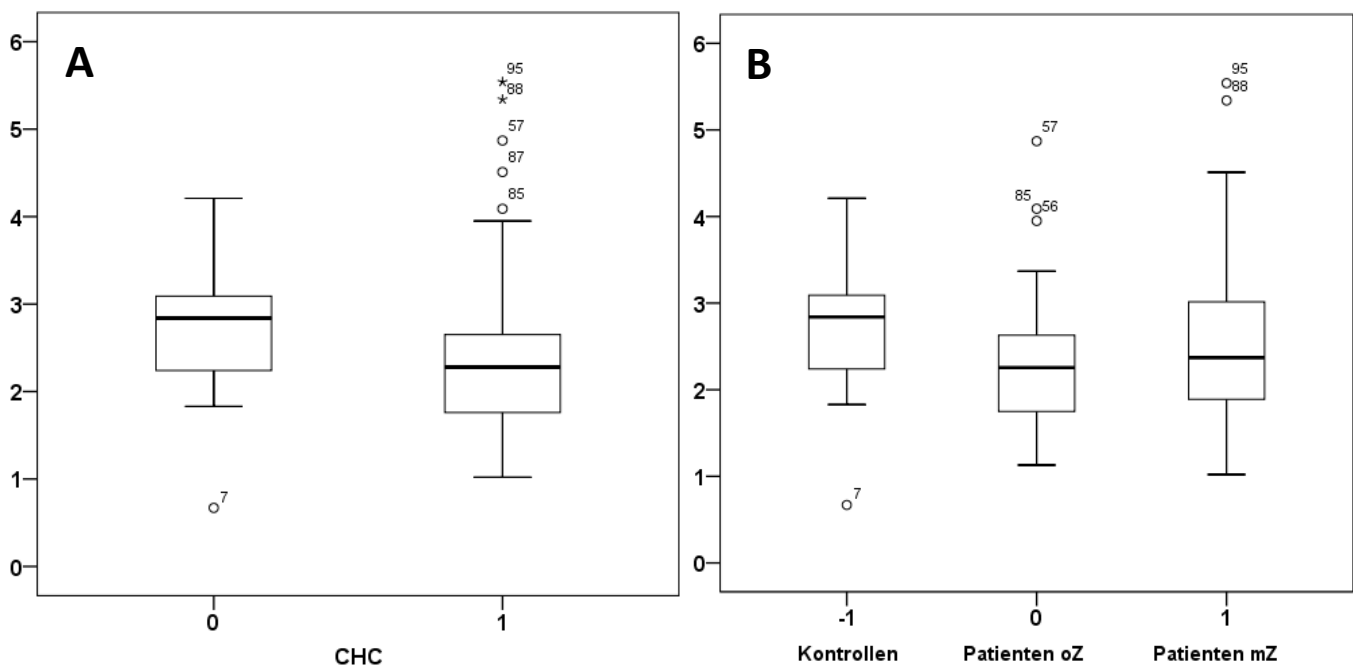


Abbildung 17

Prozentsatz neutrophiler Granulozyten mit bursting ohne externen Stimulus (resting burst) von 70 Patienten im Vergleich zu 33 gesunden Kontrollen; A: Kontrollen vs Patienten; B: Kontrollen vs Patienten ohne Leberzirrhose vs Patienten mit Leberzirrhose

fMLP Priming

Nach Inkubation mit einem milden Stimulus (fMLP) war in den Patientenproben ein signifikant geringerer Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten (3,1% vs 2,1%, $p=0,027$) zur Ausschüttung reaktiver Sauerstoffradikale stimulierbar (Abbildung 18 A). Nach Auftrennung in die Patienten-Untergruppen mit und ohne Zirrhose konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Abbildung 18 B, $p=0,085$).

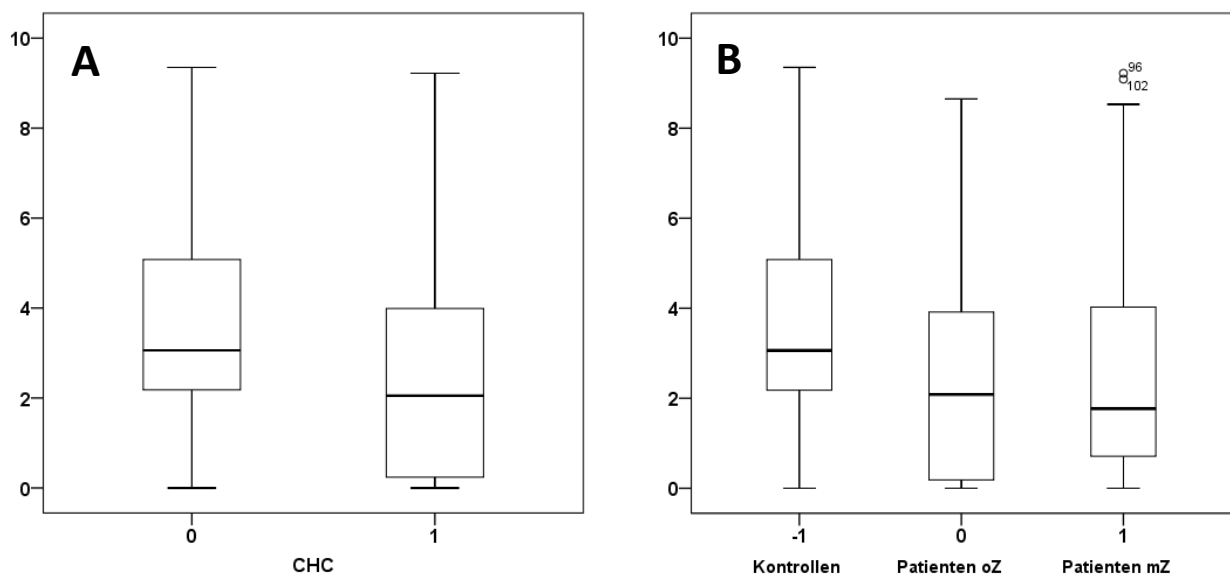


Abbildung 18

Prozentsatz neutrophiler Granulozyten mit bursting auf fMLP Stimulus von 70 Patienten im Vergleich zu 33 gesunden Kontrollen; A: Kontrollen (0) vs Patienten (1); B: Kontrollen (-1) vs Patienten ohne Leberzirrhose (0) vs Patienten mit Leberzirrhose (1)

Bursttest

Nach in-vitro Stimulation mit *e.coli* konnten signifikant weniger neutrophile Granulozyten in Patientenserum zur Ausschüttung reaktiver Sauerstoffradikale (bursttest) stimuliert werden, als bei gesunden Kontrollen (99,1% vs 98,3%, $p=0,002$), wobei sich dieser Unterschied auf eine schlechtere Stimulierbarkeit der Patienten ohne Leberzirrhose zurückführen ließ (99,1% vs 97,9%, $p=0,001$). Der Unterschied zu Patienten mit Leberzirrhose war nicht signifikant.

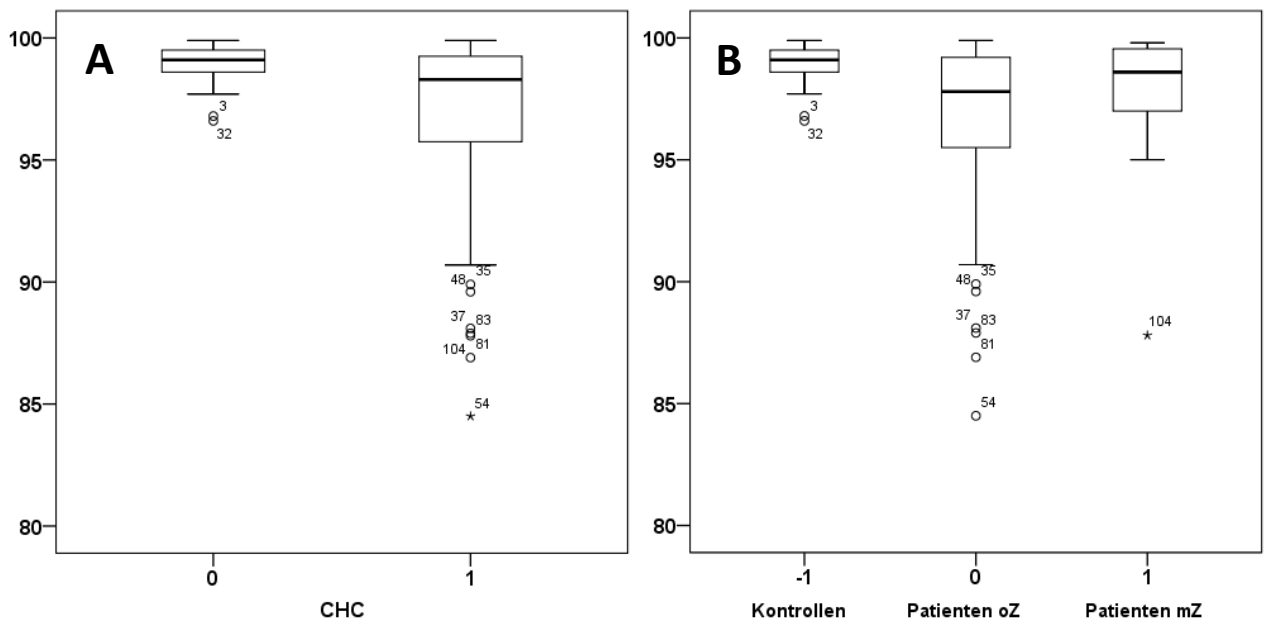


Abbildung 19

Prozentsatz neutrophiler Granulozyten, welche auf einen externen Stimulus (mit *e. coli*) zur Ausschüttung reaktiver Sauerstoffradikale stimuliert werden konnten von 70 Patienten im Vergleich zu 33 gesunden Kontrollen; A: Kontrollen (0) vs Patienten (1); B: Kontrollen (-1) vs Patienten ohne Leberzirrhose (0) vs Patienten mit Leberzirrhose (1)

Korrelation von Neutrophilenfunktion und Albuminoxidation

Die Parameter der Neutrophilen(dys)funktion wurden mit den Oxidationsstufen des HSA (HMA, HNA1 und HNA2) korreliert. Es zeigten sich lediglich signifikante Korrelationen der globalen Phagozytosekapazität (Phago – Index) mit HMA ($\rho=0,358$; $p=0,002$), HNA1 ($\rho=-0,354$; $p=0,003$) und HNA2 ($\rho=-0,332$; $p=0,005$).

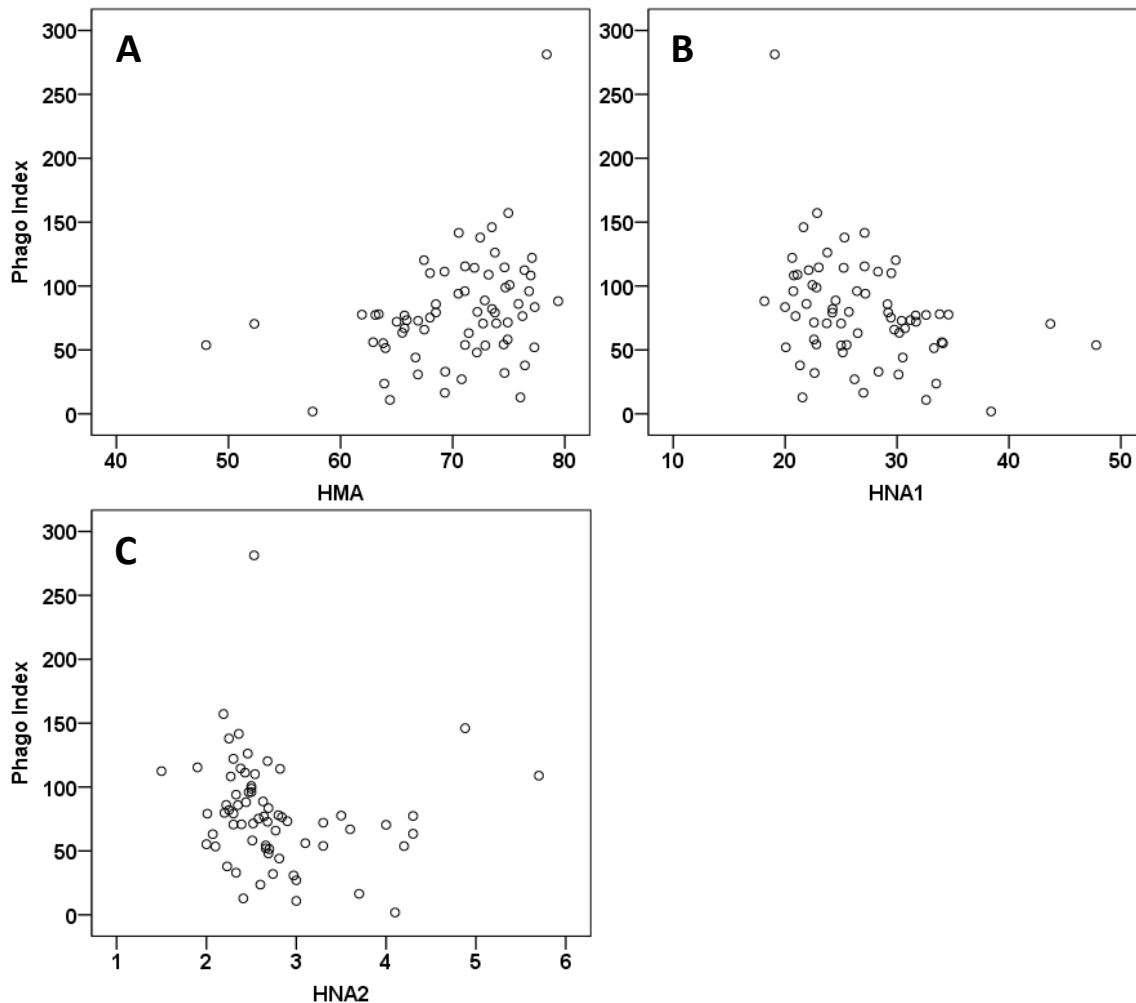


Abbildung 20

Punktdiagramme des Zusammenhanges der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten und den Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2, die eine jeweils mäßig gute Korrelation zeigen

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Albumindysfunktion im Sinne der reversiblen und irreversiblen Albuminoxidation an Patienten mit chronischer Lebererkrankung (durch Alkohol und CHC bedingte Leberzirrhose und CHC ohne Leberzirrhose) untersucht. Auf Basis der bisherigen Literatur zur Albuminoxidation bei Lebererkrankung wurden zu klärende Fragen formuliert und an einer im Vergleich zu bisherigen Studien großen Patientenzahl, welche teilweise auch durch multizentrische Rekrutierung erreicht wurde, überprüft. Insbesondere sind die Zahlen an Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose (n=360, bisher publiziert: n=49^{44,46,47,48,49}) und CHC (n=70, bisher keine publizierten Daten) repräsentativ.

Zunächst konnte das Vorliegen großer Mengen an (höhergradig) oxidiertem Albumin bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose an 360 Patienten (n=27 aus der Grazer Kohorte der *CANONIC* – Studie, n=333 aus einem multinationalen Sample dieser Studie) bestätigt werden. Die gemessenen Werte liegen mit 40-46 % HNA1 und ~7 % HNA2 deutlich über jenen von Patienten mit Niereninsuffizienz und anderen extrahepatischen Erkrankungen und numerisch auch leicht über jenen von Patienten mit Sepsis, sind jedoch im Vergleich zu bisher, insbesondere aus der Grazer Gruppe publizierten Daten, für dekompensierte Leberzirrhose / ACLF vergleichsweise niedrig. Lediglich die Messwerte für Patienten mit höhergradigem ACLF (Grade 2 und 3) erreichen die bisher publizierten HNA – Anteile. Die Korrelationen zwischen den Albuminfraktionen und den MELD- und Child-Pugh Scores waren in der *CANONIC* - Kohorte jeweils signifikant ($p < 0,001$), in den Grazer Daten zeigte sich zumindest HNA2 signifikant korreliert. Die Stärke der Korrelationen ist jedoch lediglich für HNA2 mit 0,45 – 0,55 relevant.

Bemerkenswerter Weise sind die Patientencharakteristika der 27 Grazer *CANONIC* – Patienten hinsichtlich Alter und Geschlechtsverteilung und der Schwere der Lebererkrankung (anhand von MELD und Child-Pugh Score) im Vergleich zu den 333 auswärtigen Patienten nicht unterschiedlich. Dementsprechend unterschieden sich auch die Albuminfraktionen zwischen den beiden Populationen nicht signifikant.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich lediglich in der Ursache der Leberzirrhose (mehr alkoholbedingte Leberzirrhosen in Graz) und der Ursache der ungeplanten

Krankenhausaufnahme (mehr Aufnahmen aufgrund gastrointestinaler Blutung und weniger Aufnahmen aufgrund Ascites oder hepatischer Encephalopathie in Graz) signifikant voneinander. Daher wurden diese Subgruppen auch im Rahmen der Untersuchungen hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit (ROC – Analysen für das Überleben zu 90 und 365 Tagen) der Albuminfraktionen berücksichtigt und separat ausgewertet.

In der kleineren, Grazer Patientenkohorte der *CANONIC* - Studie zeigte sich die bisherige Hypothese eines sehr guten prognostischen Wertes des HNA2 – ähnlich den bereits publizierten (Grazer) Daten^{43,49} – bestätigt, eine numerisch bessere Vorhersagekraft als MELD und Child-Pugh Score konnte sowohl für das 90-Tage als auch für das 1-Jahres-Überleben reproduziert werden. Dies bestätigte sich jedoch in der Gesamtauswertung aller 333 europäischen Patienten mit ungeplanter Krankenhausaufnahme aufgrund dekompensierter Leberzirrhose, der bisher größten mit dieser Fragestellung, nicht durchgehend. In der Analyse der Patienten ohne ACLF zeigte sich eine mit MELD und Child-Pugh Score numerisch vergleichbare und statistisch nicht unterschiedliche Performance, die jedoch bei Patienten mit ACLF deutlich schlechter war. Dies ist überraschend, da die Patienten in den bisher publizierten Grazer Studien deutlich schwerer dekompensiert und HNA2 bei diesen Patienten deutlich nützlicher war. Lediglich in der Gruppe ACLF 2 scheint eine Überlegenheit des HNA über MELD und Child-Pugh Score vorzuliegen. Insgesamt zeigt sich also eine ausgezeichnete, dem MELD überlegene prognostische Wertigkeit des HNA2 in den Grazer Patientenkollektiven, die multizentrisch nicht durchgehend nachvollzogen werden kann. HNA2 ist jedoch – insbesondere bei der Ein-Jahres-Mortalität – als Einzelparameter vergleichbar aussagekräftig wie der MELD – Score. Mögliche Ursachen für die unterschiedlich gute Diskrimination der Albuminfraktionen zwischen den Grazer Daten und jenen, die multizentrisch erhoben wurden, sind nicht vollständig klar.

Zunächst scheint es kein Effekt unterschiedlich schwer kranker Patienten bei Krankenhausaufnahme zu sein, nachdem diese Werte (MELD, Child-Pugh) vergleichbar waren. Auch nach Durchführung der Subanalysen für jene Patientencharakteristika, welche zum Einschluss signifikant differierten (Vorliegen einer alkoholischen Leberzirrhose und Ascites, hepatische Encephalopathie und gastrointestinale Blutung als Grund der Krankenhausaufnahme) zeigte sich kein einheitliches Bild zur Erklärung der

AUROC – Unterschiede. Die relativ lange Probenlagerung vor Messung der Albuminfraktionen bei den Patienten der *CANONIC* – Studie (~18 Monate) im Vergleich zu wenigen Wochen bei den Grazer Patienten ist ein möglicher Einflussfaktor auf die Höhe von HNA1 (und möglicherweise auch HNA2) und könnte die Ergebnisse somit verzerrt haben.⁷¹ Ein wahrscheinlicher, jedoch anhand der Daten nicht sicher nachvollziehbarer Grund der Unterschiede ist die nicht standardisierte Präanalytik mit unsicherer Probenlagerung und –verarbeitung vor der HNA – Messung. Nachdem die präsentierten Albumin – Analysen erst post-hoc im Rahmen einer Zusatzstudie durchgeführt wurden und protokollgemäß keine standardisierten Zeiten von Blutabnahme bis Zentrifugation und keine standardisierte Lagerung bzw. Transport vorgesehen waren, ist dies ein wichtiger möglicher Einflussfaktor. Dies erklärt möglicherweise die jeweils gute bis sehr gute Performance des HNA in Grazer Patientengruppen (mit nachvollziehbarer und relativ kurzer präanalytischer Phase) und die eingeschränkte Wertigkeit im auswärtigen Patientenkollektiv. Die Messung des HNA kann zum derzeitigen Zeitpunkt also nicht als gleichwertiger oder besserer Prognoseparameter als der MELD- oder Child-Pugh Score bei dekompenzierter Leberzirrhose angesehen werden, wenngleich Daten an großen, standardisierten Patientengruppen, die prospektiv für diese Fragestellung gesammelt wurden, fehlen.

Neben der prognostischen Wertigkeit der oxidierten Albuminfraktionen konnten in dieser Dissertation auch methodische Aspekte der Albuminmessung und –quantifizierung beim Patienten mit chronischer Lebererkrankung untersucht werden. Zunächst zeigte sich beim Vergleich der Entnahmeorte aus zentralvenösem Blut und jenem des direkten Abstromgebietes der Leber aus der Lebervene kein klinisch relevanter Unterschied der Albuminfraktionen. Die Abweichungen sind mit rund 0,8% zwischen HMA und HNA1 zwar formal signifikant jedoch numerisch minimal, die wichtige Quantifizierung des HNA2 ist zudem unabhängig vom Entnahmeort. Zudem zeigte sich nicht die möglicherweise erwartete Verteilung der HMA und HNA1 – Werte mit höherer HMA – Konzentration direkt „nach“ der Leber und höherem HNA1 systemisch, die Messwerte ergaben im Gegenteil systemisch mehr HMA (Mittelwert 55,0 vs 54,6%).

Ein weiterer relevanter methodischer Aspekt der Dissertation ist der Vergleich der Quantifizierungsmethoden nach erfolgter HMA/HNA – HPLC. Die bisherige

Quantifizierungsmethode über die Relation der Peakhöhen wurde hier der (mathematisch vermutlich korrekteren) Methode über die Relation der Peakflächen, dem Integral der HPLC – Kurve entsprechend, gegenübergestellt. Dazu wurden insgesamt 542 Patientenproben (406 mit Leberzirrhose und 136 Patienten ohne Leberzirrhose) mit beiden Quantifizierungsmethoden vermessen. Dabei zeigten sich systematische Messabweichungen zwischen den Quantifizierungsmethoden. Insbesondere für HNA2 fiel eine über alle untersuchten Gruppen konsistente und möglicherweise relevante Überschätzung der Werte mittels Peakhöhenmessung von 20-25% (jeweils $p < 0,001$) auf. Diese deutliche Überschätzung könnte in Hinblick auf eine mögliche Verwendung des HNA2 als Biomarker zur Prognoseabschätzung sicherlich zusätzliche Bedeutung haben. HMA und HNA1 hingegen werden mit den alternativen Methoden zwar teilweise statistisch signifikant, jedoch prozentuell kaum relevant (0-6%, darüber hinaus lediglich Abweichung des HNA1 bei nicht-zirrhatischen Patienten um 12%) unterschiedlich gemessen. Auf Basis dieser Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich gerechtfertigt, zukünftig auf die Quantifizierung der Albuminfraktionen mittels Peak-höhenmessung zu verzichten und diese ausschließlich über die Peakflächen durchzuführen, um verlässliche und belastbare Messwerte zu erhalten.

Daten zu Albuminfraktionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C – Infektion existierten bisher nicht und werden in dieser Arbeit erstmals an 70 Patienten im Vergleich mit 20 gesunden Kontrollen beschrieben. Zudem konnten die Messungen nach dem Vorliegen einer Leberzirrhose ($n=19$ mit und $n=49$ ohne Leberzirrhose) getrennt betrachtet werden. Im Vergleich zur Gesamtgruppe unterschieden sich alle Albuminfraktionen signifikant (im Sinne niedrigeren HMAs und höheren oxidierten Subfraktionen bei Patienten) zwischen Patienten und Kontrollen. Patienten ohne Leberzirrhose wiesen zwar signifikant unterschiedliche HMA- und HNA1 – Anteile im Vergleich zu Kontrollen auf, die Absoluthöhe der Unterschiede war jedoch minimal und ist vermutlich klinisch kaum relevant. HNA2 war nicht unterschiedlich.

Die Situation bei Patienten mit Hepatitis C – induzierter Leberzirrhose stellte sich insofern anders dar, als um rund 10% niedrigere HMA und 10% höherer HNA1 – Werte im Vergleich zu Kontrollen gemessen wurden und sich diese Werte auch gegen nicht-zirrhatische Patienten signifikant unterschieden. Ebenso waren die Zirrhotiker unter den

Hepatitis C – Patienten diejenigen mit relevant erhöhten HNA2 – Anteile. Im Vergleich zu den *CANONIC* - Patienten mit alkoholinduzierter Leberzirrhose waren HNA1 – Werte um rund 10% niedriger und HNA2 nur rund halb so hoch, wobei einschränkend ergänzt werden muss, dass es sich bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C um kompensierte, ambulant behandelte Zirrhotiker handelte und nicht um dekompenzierte, hospitalisierte Patienten (daher wurde auch kein statistischer Vergleich berechnet). Im „historischen“ Vergleich mit vormals publizierten Daten für kompensierte alkoholische Leberzirrhosen zeigt sich eine ähnliche Relation (10% mehr HNA1, rund doppelte Anteile HNA2).

Zusammenfassend konnte also bei Patienten mit CHC sowohl ein Einfluss der Hepatitis C – Infektion als auch der Leberzirrhose auf den Oxidationsstatus des HSA im Sinne größerer Anteile an oxidiertem Albumin gezeigt werden, wobei der Effekt bei Patienten mit CHC ohne Leberzirrhose minimal, und dieser bei Patienten mit CHC und Leberzirrhose weniger ausgeprägt als bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose war.

Abschließend wurde erstmals die Funktion neutrophiler Granulozyten bei Patienten mit CHC in Abhängigkeit der oxidativ veränderten Albuminfraktionen beschrieben. Unter den Parametern der Neutrophilenfunktion zeigten sich bei der globalen Phagozytosekapazität (Phago-Index) signifikante Korrelationen zu allen Albuminfraktionen im Sinne einer positiven Korrelation mit HMA und negativen Korrelationen mit HNA1 und 2, wenngleich die Stärke der Korrelationen mäßig war.

Patienten mit CHC und Leberzirrhose wiesen die am stärksten eingeschränkte Phagozytosekapazität auf (60% vs 110% des internen Standards bei Kontrollen). Dies war aus Vordaten mit Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose erwartbar, jedoch überraschte eine doch deutlich eingeschränkte Phagozytosekapazität bei Patienten mit CHC ohne Leberzirrhose (86%). Dies ist insofern unerwartet und bemerkenswert, da bei dieser Patientengruppe klinisch keine erhöhte Infektneigung, im Gegensatz zu zirrhotischen Patienten, beobachtet wird. Ebenso eingeschränkt zeigte sich – in erster Linie bei zirrhotischen Patienten – die Stimulierbarkeit der Neutrophilen hinsichtlich Ausschüttung von ROS mit verschiedenen Reizen (chemisch und bakteriell). Die Unterschiede waren jedoch gering und sind vermutlich eher auf den Einfluss der Leberzirrhose als auf jenen der CHC zurückzuführen.

Die Hypothese eines erhöhten resting-burst bei Patienten mit CHC, welcher zu einer vermehrten Albuminoxidation führen könnte, konnte aus den vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Obwohl diese Patientengruppe geringfügig erhöhte oxidierte Albuminfraktionen aufwies, zeigte sich der Prozentsatz der Neutrophilen, welche bereits ohne Stimulus ROS ausschütteten, im Vergleich zu Kontrollen sogar vermindert. Der vermutete Zusammenhang ist somit nicht nachvollziehbar.

Konklusion und Ausblick:

Die für diese Dissertation formulierten methodischen und inhaltlichen Fragen konnten mit repräsentativen Patientenzahlen beschrieben und beantwortet werden. Während bei Patienten mit dekompensierter alkoholischer Leberzirrhose eine Charakterisierung der Albuminfraktionen auch für Subgruppen (ACLF, Ursache der Krankenhausaufnahme) durchgeführt wurde und die vergleichsweise hohen Fraktionen an HNA1 und 2 aus Vorstudien bestätigt werden konnten, sind bei Patienten mit CHC die Albuminveränderungen eher diskret. HNA2 als Biomarker bei dekompensierter Leberzirrhose scheint ohne eine präanalytische Standardisierung nicht universell einsetzbar. Wichtige methodische Fragestellungen (Quantifizierung der Albuminfraktionen nach der Messung und Unterschiede zwischen verschiedenen Messorten) konnten ebenfalls geklärt werden. Eine Quantifizierung mittels Peakhöhe scheint einer solchen mittels Peakfläche unterlegen zu sein, der venöse Entnahmeort der Proben spielt keine Rolle.

Im Hinblick auf die vielversprechenden Vordaten und die medizinische Notwendigkeit eines von leicht veränderbaren Laborwerten unabhängigen und schwer manipulierbaren Biomarkers bei Leberzirrhose (HNA2) sollten sich zukünftige Forschungsaktivitäten großen, methodisch gut standardisierten Patientenkollektiven auf diesem Gebiet widmen.

5 Literaturverzeichnis

- ¹ Peters T. All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. San Diego: Academic Press; 1996.
- ² Guyton A, Hall J. The Microcirculation and the Lymphatic System. In Gruliow R. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2006.
- ³ <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=37>, abgerufen am 31.01.2015
- ⁴ Lu J, Stewart AJ, Sadler PJ, Pinheiro TJT, Blindauer CA. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec;36(Pt 6):1317–21.
- ⁵ <http://www.uniprot.org/uniprot/P02768>, abgerufen am 31.01.2015
- ⁶ Gatta A, Verardo A, Bolognesi M. Hypoalbuminemia. *Intern Emerg Med.* 2012 Oct;7 Suppl 3:S193–199.
- ⁷ Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal.* 1999;13(6):273–9.
- ⁸ Salerno F, Navickis RJ, Wilkes MM. Albumin infusion improves outcomes of patients with spontaneous bacterial peritonitis: a meta-analysis of randomized trials. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Feb;11(2):123–130.e1.
- ⁹ Bernardi M, Caraceni P, Navickis RJ, Wilkes MM. Albumin infusion in patients undergoing large-volume paracentesis: a meta-analysis of randomized trials. *Hepatology.* 2012 Apr;55(4):1172–81.
- ¹⁰ Ortega R, Ginès P, Uriz J, Cárdenas A, Calahorra B, De Las Heras D, et al. Terlipressin therapy with and without albumin for patients with hepatorenal syndrome: results of a prospective, nonrandomized study. *Hepatology.* 2002 Oct;36(4 Pt 1):941–8.

-
- ¹¹ Neri S, Pulvirenti D, Malaguarnera M, Cosimo BM, Bertino G, Ignaccolo L, et al. Terlipressin and albumin in patients with cirrhosis and type I hepatorenal syndrome. *Dig Dis Sci*. 2008 Mar;53(3):830–5.
- ¹² Sanyal AJ, Boyer T, Garcia-Tsao G, Regenstein F, Rossaro L, Appenrodt B, et al. A randomized, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of terlipressin for type 1 hepatorenal syndrome. *Gastroenterology*. 2008 May;134(5):1360–8.
- ¹³ Martín-Llahí M, Pépin M-N, Guevara M, Díaz F, Torre A, Monescillo A, et al. Terlipressin and albumin vs albumin in patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome: a randomized study. *Gastroenterology*. 2008 May;134(5):1352–9.
- ¹⁴ Garcia-Martinez R, Caraceni P, Bernardi M, Gines P, Arroyo V, Jalan R. Albumin: pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology*. 2013 Nov;58(5):1836–46.
- ¹⁵ [http://dan.corlan.net/cgi-bin/medline-trend?Q=%22Serum+Albumin%22\[Mesh\]+](http://dan.corlan.net/cgi-bin/medline-trend?Q=%22Serum+Albumin%22[Mesh]+), abgerufen am 22.01.2015
- ¹⁶ Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Oct;8(9-10):1865–79.
- ¹⁷ Anraku M, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1830(12):5465–72.
- ¹⁸ Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. *Eur J Biochem*. 2001 Jan;268(1):42–7.
- ¹⁹ Weissman N, Schoenbach EB, Armistead EB. The determination of sulfhydryl groups in serum. I. Methods and results on normal sera. *J Biol Chem*. 1950 Nov;187(1):153–65.
- ²⁰ Quinlan GJ, Margaron MP, Mumby S, Evans TW, Gutteridge JM. Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clin Sci*. 1998 Oct;95(4):459–65.

-
- ²¹ Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JMC, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 2004 Mar;32(3):755–9.
- ²² <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1BM0&bionumber=1>, Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. PDB code: 1BM0 (human serum albumin), abgerufen am 31.01.2015
- ²³ Hughes WL. An albumin fraction isolated from human plasma as a crystalline mercuric salt. *J Am Chem Soc*. 1947 Jul;69(7):1836.
- ²⁴ Hughes WL, Dintzis HM. CRYSTALLIZATION OF THE MERCURY DIMERS OF HUMAN AND BOVINE MERCAPTALBUMIN. *J Biol Chem*. 1964 Mar;239:845–9.
- ²⁵ Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*. 2007 Jul;151(5):580–90.
- ²⁶ Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabegger G, Hofmann P, Oettl K. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol*. 2008 Jun;104(6):1611–7.
- ²⁷ Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Biochemistry*. 2003 Aug 26;42(33):9906–14.
- ²⁸ Andersson LO. The heterogeneity of bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1966 Mar 28;117(1):115–33.
- ²⁹ Summa D, Spiga O, Bernini A, Venditti V, Priora R, Frosali S, et al. Protein-thiol substitution or protein dethiolation by thiol/disulfide exchange reactions: the albumin model. *Proteins*. 2007 Nov 1;69(2):369–78.

-
- ³⁰ Jeong W, Park SJ, Chang T-S, Lee D-Y, Rhee SG. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14400–7.
- ³¹ Taverna M, Marie A-L, Mira J-P, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):4.
- ³² Leto S, Yiengst MJ, Barrows CH. The effect of age and protein deprivation on the sulfhydryl content of serum albumin. *J Gerontol*. 1970 Jan;25(1):4–8.
- ³³ Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Feb 22;1247(1):12–6.
- ³⁴ Era S, Hamaguchi T, Sogami M, Kuwata K, Suzuki E, Miura K, et al. Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res*. 1988 May;31(5):435–42.
- ³⁵ Imai H, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K, et al. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol*. 2002 Apr;52(2):135–40.
- ³⁶ Soejima A, Matsuzawa N, Hayashi T, Kimura R, Ootsuka T, Fukuoka K, et al. Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. *Blood Purif*. 2004;22(6):525–9.
- ³⁷ Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int*. 2004 Nov;66(5):1988–93.
- ³⁸ Matsuyama Y, Terawaki H, Terada T, Era S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2009 Aug;13(4):308–15.

-
- ³⁹ Terawaki H, Takada Y, Era S, Funakoshi Y, Nakayama K, Nakayama M, et al. The redox state of albumin and serious cardiovascular incidence in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2010 Oct;14(5):465–71.
- ⁴⁰ Regazzoni L, Del Vecchio L, Altomare A, Yeum K-J, Cusi D, Locatelli F, et al. Human serum albumin cysteinylolation is increased in end stage renal disease patients and reduced by hemodialysis: mass spectrometry studies. *Free Radic Res.* 2013 Mar;47(3):172–80.
- ⁴¹ Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K, et al. Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992 Dec;18(3):153–8.
- ⁴² Hayakawa A, Kuwata K, Era S, Sogami M, Shimonaka H, Yamamoto M, et al. Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997 Sep 26;698(1-2):27–33.
- ⁴³ Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):978–83.
- ⁴⁴ Sogami M, Era S, Nagaoka S, Kuwata K, Kida K, Shigemi J, et al. High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. II. *J Chromatogr.* 1985 Sep 20;332:19–27.
- ⁴⁵ Oettl K, Greilberger J, Stadlbauer V, Petter F, Lackner C, Putz-Bankuti C et al. (2006). Redox state of serum albumin and carbonyl content of plasma proteins in advanced liver disease. *Proceedings of the 13th Biennial Congress of the Society for Free Radical Research International.* Medimond: Bologna, pp 265–268.
- ⁴⁶ Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallström S, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Aug;1782(7-8):469–73.
- ⁴⁷ Oettl K, Stadlbauer V, Krisper P, Stauber RE. Effect of extracorporeal liver support by molecular adsorbents recirculating system and Prometheus on redox state of albumin in acute-on-chronic liver failure. *Ther Apher Dial.* 2009 Oct;13(5):431–6.

⁴⁸ Oettl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Meth Enzymol.* 2010;474:181–95.

⁴⁹ Stauber RE, Spindelboeck W, Haas J, Putz-Bankuti C, Stadlbauer V, Lackner C, et al. Human nonmercaptalbumin-2: a novel prognostic marker in chronic liver failure. *Ther Apher Dial.* 2014 Feb;18(1):74–8.

⁵⁰ Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(7):1426–1437, 1437.e1–9.

⁵¹ Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology.* 2000 Apr;31(4):864–71.

⁵² Ruiz-Margáin A, Macías-Rodríguez RU, Duarte-Rojo A, Ríos-Torres SL, Espinosa-Cuevas Á, Torre A. Malnutrition assessed through phase angle and its relation to prognosis in patients with compensated liver cirrhosis: A prospective cohort study. *Dig Liver Dis.* 2015 Jan 3;

⁵³ Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: *The liver and portal hypertension.* Edited by CG Child. Philadelphia: Saunders, 1964: 50-64.

⁵⁴ Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973 Aug;60(8):646–9.

⁵⁵ Joseph KS, Moser AC, Basiaga SBG, Schiel JE, Hage DS. Evaluation of alternatives to warfarin as probes for Sudlow site I of human serum albumin: characterization by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 2009 Apr 17;1216(16):3492–500.

⁵⁶ Mallik R, Yoo MJ, Chen S, Hage DS. Studies of verapamil binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Dec 1;876(1):69–75.

-
- ⁵⁷ Joseph KS, Hage DS. Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010 Jun 1;878(19):1590–8.
- ⁵⁸ Rahim S, Aubry AF. Location of binding sites on immobilized human serum albumin for some nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharm Sci.* 1995 Aug;84(8):949–52.
- ⁵⁹ Chen J, Ohnmacht C, Hage DS. Studies of phenytoin binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Sep 25;809(1):137–45.
- ⁶⁰ Joseph KS, Hage DS. The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan. *J Pharm Biomed Anal.* 2010 Nov 2;53(3):811–8.
- ⁶¹ Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2009 May;29(2):141–54.
- ⁶² Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GAK, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology.* 2007 Sep;46(3):831–40.
- ⁶³ Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GAK, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 2008 Jun;48(6):945–51.
- ⁶⁴ Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010 Jul;162(1):95–109.
- ⁶⁵ Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Nov;11(11):2685–700.
- ⁶⁶ Jalan R, Bernardi M. Effective albumin concentration and cirrhosis mortality: from concept to reality. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):918–20.

⁶⁷ Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, Sen S, Cheshire L, Hodges S, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology*. 2009 Aug;50(2):555–64.

⁶⁸ Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950 Jan;3(1):32–5.

⁶⁹ DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988 Sep; 44(3):837-45.

⁷⁰ Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8;1(8476):307–10.

⁷¹ Hayashi T, Suda K, Imai H, Era S. Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the investigation of dynamic changes in the redox state of rat serum albumin. *J. Chromatogr. B*. 2002 May 25;772(1):139-46.