

Diplomarbeit

**Einfluss einer Hämodialyse-Behandlung auf den Redox-
Zustand von Albumin im Zusammenhang mit der
Konzentration der Plasma-Thiole und Disulfide**

eingereicht von

Joachim Enzendorfer

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Karl Öttl

Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer. nat. Margret Paar

Graz, am 18. April 2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 18. April 2018

Joachim Enzendorfer eh

Danksagungen

Mein großer Dank gilt meinen beiden Betreuern Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl Öttl und Frau Mag. Drⁱⁿ. Margret Paar, die es mir mit Rat und Tat ermöglicht haben, diese Arbeit zu verfassen. Weiters gilt mein Dank Frau Doris Payerl, die sämtliche Messungen an der HPLC durchgeführt und so erst eine Auswertung ermöglicht hat. Zusätzlich möchte ich mich auch bei Frau Sandra Lemesch für die Unterstützung bei den Probennahmen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt der klinischen Abteilung für Nephrologie, allen voran Frau Drⁱⁿ. med. Katharina Artinger und Herrn Dr. med. Andras Deak sowie dem gesamten Team der Hämodialysestation am LKH Graz.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Marlies, du hast mich immer unterstützt und bist mir mit deiner Liebe und deinem Know-how auch in den schwierigeren Zeiten zur Seite gestanden. Ich danke dir so sehr dafür!

Vroni, vielen Dank für deine Hilfe bei der Statistik!

Max, Stefan, Patrick und Maria, es ist großartig, euch als Freunde gefunden zu haben. Ich werde die Zeit in Graz mit euch vermissen!

Zusammenfassung

Hintergrund

Patientinnen und Patienten mit chronischem Nierenversagen leiden unter oxidativem Stress, der zu einer oxidativen Veränderung am Cystein-34 des Albuminmoleküls führen kann. Cystein-34 kann als Thiol, als Disulfid oder als Sulfin- und Sulfonsäure vorliegen. Man spricht vom humanem Mercaptalbumin (HMA), humanem Nonmercaptalbumin-1 (HNA-1) und humanem Nonmercaptalbumin-2 (HNA-2). Plasma-Thiole und Disulfide, die mangels Nierenfunktion ebenfalls verändert sind, stehen in einem ständigen Austausch mit dem Cystein-34 (Thiol-Disulfid-Austausch). Sie können im Gegensatz zu Albumin durch Dialyse entfernt werden. Die daraus resultierende dynamische Situation ermöglicht, den Einfluss einer Dialyse auf den Redoxzustand von Albumin in Abhängigkeit der Plasma-Thiole/Disulfide zu untersuchen.

Methodik

Um den möglichen Zusammenhang zwischen dem Redox-Zustand von Albumin und der Thiol-/Disulfid-Konzentration im Plasma zu erforschen, wurden bei zwanzig Patientinnen und Patienten Blutproben vor und nach der Dialyse-Behandlung abgenommen. Die Proben wurden mittels High-Performance-Liquid-Chromatography im Hinblick auf Thiole/Disulfide, sowie HMA, HNA-1 und HNA-2 untersucht und die daraus resultierenden Daten statistisch analysiert.

Resultate

Dass bei Dialysepatienten der Anteil an HMA gegenüber gesunden Personen verringert ist und eine Dialysebehandlung den Redox-Zustand von Albumin in Richtung HMA verschiebt, konnte bestätigt werden. Die in der Literatur beschriebene Methode zur Bestimmung der Plasma Thiole/Disulfide konnte trotz zahlreicher und langwieriger Versuche keine ausreichend reproduzierbaren und verlässlichen Daten liefern. Deshalb konnte der mögliche Zusammenhang zwischen dem Redox-Zustand von Albumin und den Plasma-Thiolen und Disulfiden leider nicht geklärt werden.

Conclusio

Wie erwartet nähert sich der Redoxzustand von Albumin durch die Dialysebehandlung dem physiologischen Zustand an. Es ist anzunehmen, dass sich die Plasma-Thiole und Disulfide ebenso verhalten. Die verwendete Methode erwies sich jedoch überraschenderweise als ungeeignet.

Abstract

Background

Patients with chronic renal failure suffer from oxidative stress, which can lead to oxidative changes at the cysteine-34 of the albumin molecule. Cysteine-34 can exist as thiol, disulfide, or sulfinic/sulfonic acid. One speaks of human mercaptalbumin (HMA), human nonmercaptalbumin-1 (HNA-1), and human nonmercaptalbumin-2 (HNA-2). Plasma thiols and disulfides, which are altered due to lack of kidney function as well, are in constant exchange with cysteine-34 (thiol-disulfide-exchange). Unlike albumin they can be removed through dialysis. The resulting dynamic situation allows observing the influence of dialysis on the redox-state of albumin in dependence of the plasma-thiols/disulfides.

Method

To assess a possible association between the redox-state of albumin and the thiol/disulfide concentration in plasma, blood samples of twenty patients were taken before and after dialysis. The samples were examined using high-performance-liquid-chromatography with regard to thiols/disulfides as well as HMA, HNA-1, and HNA-2 and the resulting data were statistically analyzed.

Results

Within this study it was confirmed that in dialysis patients the proportion of HMA is reduced compared to healthy persons and that dialysis treatment shifts the redox state of albumin towards HMA. Despite numerous and effortful attempts, the method for determining the plasma thiols/disulfides described in the literature could not provide sufficiently reproducible and reliable data. Therefore, unfortunately, the association between the redox-state of albumin and the plasma-thiols/disulfides could not be elucidated.

Conclusion

As expected, the redox state of albumin approaches the physiological state through dialysis-treatment. It can be assumed that the plasma thiols and disulfides behave the same way. However, the method applied surprisingly proved to be inappropriate.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
Zusammenfassung	4
Abstract	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Die Nieren	8
1.1.1 Makroskopischer Aufbau	8
1.1.2 Mikroskopischer Aufbau.....	9
1.1.3 Pathophysiologie der Niere	10
1.1.4 Arten von Nierenersatzverfahren	11
1.1.5 Dialysatoren und Biokompatibilität	14
1.1.6 Dialysat.....	14
1.2 Reaktive Spezies, antioxidative Strategien und oxidativer Stress	15
1.2.1 Antioxidative Strategien.....	16
1.2.2 Oxidativer Stress	17
1.3 Albumin	18
1.4 Thiole und Disulfide	20
1.5 Ziel der Diplomarbeit	20
2 Studiendesign, Rekrutierung und Methoden	21
2.1 Albumin	22
2.1.1 Materialgewinnung.....	22
2.1.2 Analyse.....	22
2.2 Thiole	23
2.2.1 Materialgewinnung.....	23
2.2.2 Probenaufarbeitung.....	23
2.2.3 Derivatisierung der Proben.....	24
2.2.4 Analyse.....	24
2.3 Statistische Analyse	25
3 Ergebnisse	25
3.1 Beschreibung der Patientinnen und Patienten	25
3.2 Ergebnisse der HPLC-Messungen der Albuminfraktionen	26
3.2.1 Chromatogramme	26
3.2.2 Statistische Auswertung	27

3.3	Ergebnisse der HPLC-Messungen der Plasma-Thiole	33
3.3.1	Chromatogramme	33
3.4	Ergebnisse des Zusammenhangs zwischen den Albumin- fraktionen und den Plasmathiolen	37
4	Diskussion.....	37
5	Abbildungsverzeichnis	41
6	Tabellenverzeichnis	42
7	Literaturverzeichnis	44
8	Rohdaten & Dokumente	48
8.1	Albuminmessung.....	48
8.2	Blutbild	49
8.3	Routinelaborwerte	50
8.4	Dokumente.....	51
8.4.1	Informed Consent	51
8.4.2	Ethikvotum positiv	54

1 Einleitung

1.1 Die Nieren

Die Nieren sind im menschlichen Körper die wichtigsten Organe zur Entfernung von Stoffwechselendprodukten und weiteren Abbauprodukten, wie zum Beispiel von Medikamenten (1–3). Kreatinin, das als Endprodukt des Energiestoffwechsels anfällt, spielt als harnpflichtige Substanz eine besondere Rolle. Da es fast ausschließlich filtriert und nicht rückresorbiert wird, dient es als Marker für die Berechnung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) (siehe Kap. 1.1.2) (2).

Als vielfältige Organe sind die Nieren auch an der Glukoneogenese, der Regelung des Blutdrucks (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System RAAS) und des Säure-Basen-Haushalts (H^+ -Ionen-Ausscheidung), dem Knochenstoffwechsel (letzter Schritt der Vitamin-D-Bildung) sowie über die Erythropoietinsynthese an der Blutbildung beteiligt (1–4). Die Nieren benötigen ca. 10% des aufgenommenen Sauerstoffs und sind daher anfällig für oxidativen Stress (5).

Im Falle eines Nierenversagens (siehe Kapitel 1.1.3) kann die Kompensierung einer verminderten bis vollständig ausgefallenen Filtration der Nieren durch Nierenersatzverfahren (siehe Kapitel 1.1.4) erforderlich sein.

Im Folgenden wird auf den makroskopischen und mikroskopischen Aufbau sowie die Funktion der Niere eingegangen.

1.1.1 Makroskopischer Aufbau

Die Nieren liegen beidseits der Wirbelsäule in einer Fettkapsel im Retroperitoneum. Während sich die linke Niere in etwa von der Höhe des zwölften Brustwirbels bis zum dritten Lendenwirbel erstreckt, ist die rechte Niere durch die Leber etwa 4 cm nach unten verschoben (6). Das Nierenparenchym wird in eine äußere Schicht, die Nierenrinde und in eine innere Schicht, das Nierenmark, gegliedert (2–4). Die Blutversorgung erfolgt zuführend über die Arteria renalis und abführend über die Vena renalis. Über das Nierenbecken und den Harnleiter wird der gebildete Harn Richtung Harnblase abtransportiert (4).

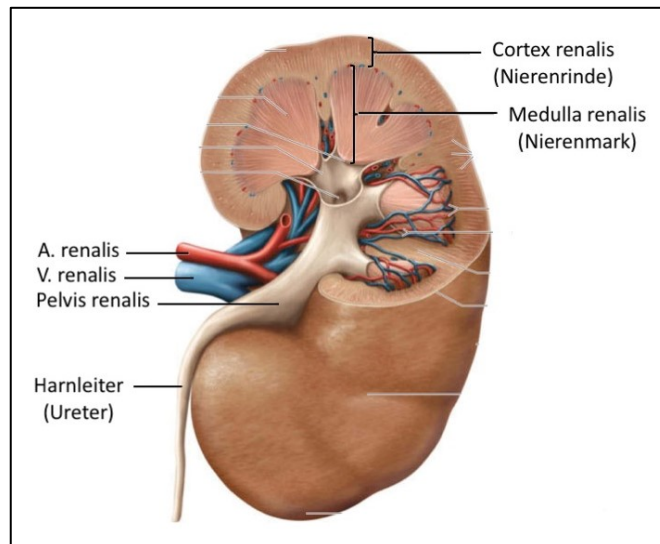


Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der Niere, adaptiert (73)

1.1.2 Mikroskopischer Aufbau

Jede Niere enthält 1-1,5 Millionen Nephronen (3). Sie stellen die eigentliche funktionelle Einheit der Niere dar. Ein Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen (Glomerulum) und aus dem daran angeschlossenen Tubulus, der wiederum in ein Sammelrohr mündet. Mehrere Sammelrohre verbinden sich zu immer größeren Gängen und enden schließlich über einen Nierenkelch im Nierenbecken (3,7).

Sämtliche Nierenkörperchen sind in der Nierenrinde zu finden. Jedes Glomerulum wird über eine zuführende Arteriole mit Blut versorgt, der Abtransport erfolgt über je eine abführende Arteriole. Im Glomerulum bilden die Arteriolen ein kleines Gefäßbündel, das von der Bowman-Kapsel umschlossen wird. Hier wird der Primärharn gebildet, der über das Tubulussystem weitertransportiert wird. Dieser ist weitgehend proteinfrei und enthält neben Wasser auch Elektrolyte und kleinere Moleküle. Er entsteht durch Ultrafiltration des Blutplasmas über einen dreilagigen Filter, der aus Endothelzellen, der Basalmembran und den Podozyten besteht (2,3,7). Stoffe mit einem Molekülradius von $r < 1,8 \text{ nm}$ werden frei hindurchgelassen. Mit steigender Größe erfolgt der Durchtritt zunehmend schlechter. Ab einem molekularen Radius von $r > 4,4 \text{ nm}$ ist der Filter undurchlässig (1,7).

Die gesunde Niere filtert Stoffe nicht nur, wie eben beschrieben, nach ihrer Molekülgröße, sondern auch nach ihrer Ladung. Die Fußfortsätze der Podozyten sind mit einer negativ geladenen Glykokalix überzogen und reduzieren den Übertritt von negativ geladenen Molekülen wie zum Beispiel Plasmaproteinen (2). Albumin ist mit einem Molekülradius von $3,4 \text{ nm}$ (1) bis $3,6 \text{ nm}$ (7) und seiner negativen Ladung normalerweise nahezu unfiltrierbar.

Am weiteren Weg des Harns werden im Tubulussystem viele Stoffe wie Wasser, Harnstoff, Na^+ und Cl^- -Ionen zu einem Großteil rückresorbiert. Filtrierte Glukose und Aminosäuren werden normalerweise fast vollständig wiederaufgenommen. Dadurch kommt es bei einem gesunden erwachsenen Menschen abhängig von der Ernährung und der Trinkmenge schlussendlich zu einer Harnmenge von 0,5-2 l/Tag (1–3).

1.1.3 Pathophysiologie der Niere

Nierenschädigungen werden nach ihrer Dauer in chronische und akute Verläufe unterteilt (6,8,9). Die Nierenfunktion kann durch eine eingeschränkte Durchblutung oder durch eine Schädigung der Glomeruli und/oder der Tubuli gestört werden (6,9). Ebenso ist eine Schädigung durch Veränderungen im Niereninterstitium oder einen Verschluss der ableitenden Harnwege, z.B. durch Harnsteine oder Tumore und dem daraus folgenden Rückstau des Harns, möglich (6). Da in der vorliegenden Studie ausschließlich Patientinnen und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eingeschlossen wurden, wird auf die akute Niereninsuffizienz in der Diplomarbeit nicht weiter eingegangen.

Die Störung der ausscheidenden Nierenfunktion zeigt sich nach einem Ausfall von etwa 60% des Nierenparenchyms. Anfänglich kommt es zu einem Anstieg der harnpflichtigen Substanzen im Körper, der aber durch eine erhöhte Harnproduktion kompensiert wird (6,8). Wird der glomeruläre Filter weiter geschädigt, ist es möglich, dass Plasmaproteine und Erythrozyten in den Primärharn gelangen. Die Proteinurie ist bei den Serumproteinen vor allem durch die Verminderung der Albuminkonzentration sichtbar. Zusätzlich gehen bei einer Nierenschädigung wichtige Substanzen wie Glukose und/oder Elektrolyte verloren (9). Im weiteren Verlauf gehen immer mehr Nephronen zu Grunde, was schlussendlich zu einem vollkommenen Verlust der Harnbildung führt (6).

Die Folgen der chronischen Niereninsuffizienz zeigen sich in einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität. Das Risiko, an einem kardiovaskulären Ereignis zu sterben, ist bei Hämodialyse-Patientinnen und Patienten zehn- bis zwanzigfach erhöht (10). Das Risiko eines 30-jährigen Patienten mit ESRD (End-Stage-Renal-Disease) an einem kardiovaskulären Ereignis zu sterben, entspricht dem eines 80-jährigen ohne Erkrankung (11).

1.1.3.1 Chronische/terminale Niereninsuffizienz

In Österreich sind ca. fünf Prozent der Bevölkerung (~400.000 Personen, Stand 2015) von einer signifikanten, chronischen Einschränkung ihrer Nierenfunktion betroffen (GFR < 60 ml/min/1,73 m²). Die Hauptursachen für eine chronische bzw. terminale Niereninsuffizienz sind Diabetes mellitus Typ I/II und Hypertonie. Andere Ursachen für chronische Niereninsuffizienz sind Glomerulonephritiden, hereditäre Erkrankungen (vor allem Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)) und interstitielle Nierenerkrankungen (12). In Westeuropa beträgt die Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz 10/100.000/Jahr, in den USA 60/100.000/Jahr (8).

Die Kriterien für die Diagnosestellung einer chronischen Niereninsuffizienz sind eine Verminderung der estimatedGFR (eGFR) von < 60 ml/min/1,73 m² und zusätzlich Zeichen einer Nierenschädigung in Serum/Urin, Bildgebung oder Histologie über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten (8,13). Die eGFR berücksichtigt Alter, Geschlecht und Hautfarbe bei der Berechnung. Sie wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$eGFR(\text{ml/min/1,73 m}^2) = \text{Serumkreatinin}^{-1,154} \times \text{Alter}^{-0,203} \times \text{Faktor}$$

Bei konventionellen Einheiten (mg/dl) lautet der Faktor 186, bei SI-Einheiten (µmol/l) 32.788. Bei Frauen ist das Ergebnis mit 0,742, bei Menschen mit schwarzer Hautfarbe mit 1,21 zu multiplizieren (8).

Abhängig von der GFR wird die chronische Niereninsuffizienz (CKD, Chronic Kidney Disease) nach den KDIGO-Leitlinien 2012 (KDIGO, Kidney Disease - Improving Global Outcomes) in fünf Stadien eingeteilt. Ab Stadium 4 (schwere Niereninsuffizienz, GFR 15 – 29 ml) wird die Nierenersatztherapie vorbereitet und ab Stadium 5 (Nierenversagen, GFR < 15 ml) durchgeführt (8,14).

1.1.4 Arten von Nierenersatzverfahren

Sowohl bei akuter Niereninsuffizienz als auch bei fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz gibt es die Möglichkeit verschiedener Nierenersatzverfahren (6,8). Bei den extrakorporalen Methoden der Hämodialyse und Hämodiafiltration (s.u.) wird das Blut außerhalb des Körpers der Patientin/des Patienten über ein Schlauchsystem zum Dialysator

(s. Kap.1.1.5) geleitet und von dort wieder zurück zur Patientin/zum Patienten. Im Gegensatz dazu steht die Peritonealdialyse, auf die in Kapitel 1.1.4.3 eingegangen wird.

1.1.4.1 Hämodialyse (HD)

Die Hämodialyse folgt dem Prinzip der Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten über eine semipermeable Membran, die je nach Indikation und Bauart für unterschiedlich große Moleküle durchlässig ist. Wie in Abbildung 2 dargestellt, strömt das Blut als hypertone Lösung an der Innenseite und das Dialysat (s. Kap. 1.1.6) hypoton auf der Außenseite der Membran eines Dialysators (s. 1.1.5). Um den Konzentrationsgradienten möglichst groß zu halten, wird zusätzlich das Gegenstromprinzip ausgenutzt (6). Die wasserlöslichen, nieder- bis mittelmolekularen Teilchen wandern entlang des osmotischen Gradienten in das Dialysat, bis deren Konzentrationen auf beiden Seiten der semipermeablen Membran isoton sind. Es kann zwischen zwei Arten der Hämodialyse unterschieden werden. Während Abbildung 2 das Fluss-Schema der Low-flux-Dialyse (Ultrafiltrationskoeffizient $< 10 \text{ ml/h/mmHg}$) darstellt, zeigt Abbildung 3 das Fluss-Schema der High-flux-Dialyse (Ultrafiltrationskoeffizient $> 10 \text{ ml/h/mmHg}$). Durch den erhöhten Wasserübertritt auf die Dialyseseite ist es erforderlich, den Volumensverlust der Patientin/des Patienten auszugleichen. Dies geschieht bei der HD im Gegensatz zur Hämofiltration bzw. Hämodiafiltration durch einen erhöhten Druck auf der Dialysatabflussseite (15).

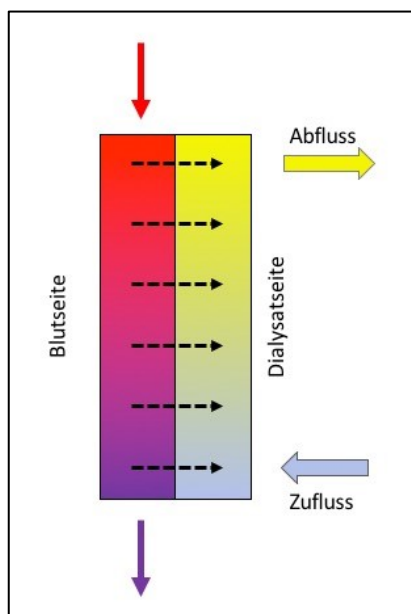


Abbildung 2: Fluss-Schema der Hämodialyse, nach (15), der Stoffaustausch erfolgt über Diffusion (strichlierte Pfeile)

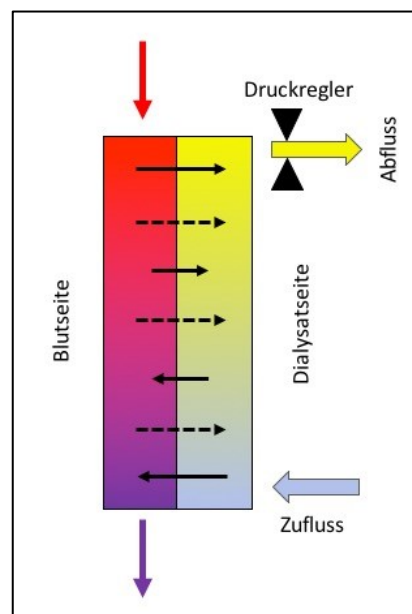


Abbildung 3: Fluss-Schema der High-flux-Dialyse nach (15). Strichlierte Pfeile stellen die Diffusion dar, durchgezogene die Konvektion.

1.1.4.2 Hämofiltration (HF) und Hämodiafiltration (HDF)

Bei der Hämofiltration erfolgt die Stoffausscheidung durch Konvektion über eine großporige, semipermeable Membran (s. Abbildung 4) (15). Der Stoffaustausch wird über einen Druckunterschied erreicht. Indem auf der Dialysatseite ein niedrigerer Druck vorliegt als auf Patientenseite, werden die auszuscheidenden Moleküle durch die semipermeable Membran gezogen (16). Auf diese Weise wird reines Plasma abfiltriert (13). Der erhöhte Volumsverlust muss in Form von Substitutionslösungen wieder ausgeglichen werden (13,15).

Bei der Hämodiafiltration werden Hämodialyse und Hämofiltration kombiniert, um so die Vorteile von beiden Verfahren (Diffusion – Entfernung niedermolekularer Substanzen und Konvektion – Entfernung größerer Moleküle) auszunutzen (s. Abbildung 5) (6,8,17). Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in einer geringeren Kreislaufbelastung (13).

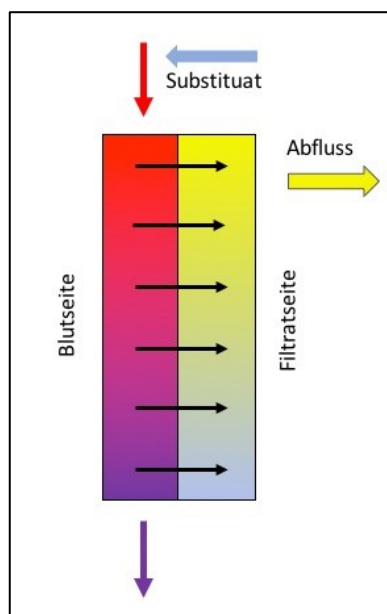


Abbildung 4: Fluss-Schema der Hämofiltration, nach (15), Der Stoffaustausch erfolgt über Konvektion (durchgezogene Pfeile)

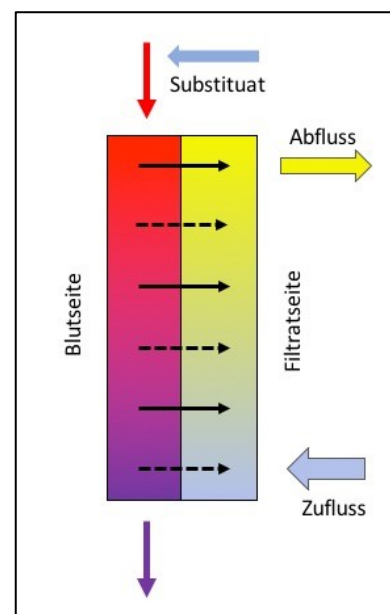


Abbildung 5: Fluss-Schema der Hämodiafiltration nach (15), Stoffaustausch mittels Diffusion (gestrichelte Pfeile) und Konvektion (durchgezogene Pfeile)

1.1.4.3 Peritonealdialyse

Ein weiteres Dialyse-Verfahren stellt die Peritoneal-Dialyse dar. Hier werden mehrmals täglich 1,5 bis 2 Liter einer glukosehaltigen Dialysat-Lösung über einen Katheter in die Bauchhöhle gebracht (6,17). Das Peritoneum dient als semipermeable Membran. Nach einigen Stunden wird die Dialysatlösung über den Katheter abgelassen und durch eine frische Lösung ersetzt (18).

1.1.5 Dialysatoren und Biokompatibilität

Der Dialysator stellt den Filter im Dialyseverfahren dar. In Kapillar- bzw. Hohlfaserdialysatoren besteht dieser aus einem Kunststoffgehäuse mit Bündeln von Kapillarröhren. Durch diese fließt das Blut, während an der Außenseite das Dialysat zirkuliert (17,19).

Die eingesetzten Membranen bestehen entweder aus synthetischen Materialien wie etwa Polyamid oder aus semisynthetischen Derivaten der Zellulose. Generell werden die Membranoberflächen bei ihrem Kontakt mit Blut als körperfremd erkannt. Dies zieht eine Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort, vor allem des Komplementsystems nach sich. Bei Membranen aus unmodifizierter Zellulose ist die Aktivierung des Komplementsystems besonders stark ausgeprägt, da sich innerhalb des Zellulose-Polymers Hydroxyl-Gruppen an den Glukosemolekülen befinden. Diese binden kovalent mit dem Komplementfaktor C3 und können so die Komplementkaskade auslösen (20).

Aufgrund ihrer Bioinkompatibilität und ihrer schlechten Stofftrennungseigenschaften werden unmodifizierte Zellulosemembranen heutzutage nicht mehr eingesetzt. Stattdessen werden Membranen aus modifizierter Zellulose verwendet. So ist bei Hemophan-Membranen an einige der Hydroxylgruppen Diethylaminoethyl gebunden, was die Komplementaktivierung verringert (19,21).

1.1.6 Dialysat

Das Dialysat besteht aus einer wässrigen Lösung von Elektrolyten und Glukose sowie Puffersubstanzen. Als Puffersubstanz wird vor allem Bikarbonat benutzt. Dies dient zum Ausgleich der metabolischen Azidose der Patientinnen und Patienten. Die, in Kapitel 1.1.4.2 angesprochenen, Substitutionslösungen weisen eine vergleichbare Zusammensetzung wie das Dialysat auf (19).

1.2 Reaktive Spezies, antioxidative Strategien und oxidativer Stress

Als reaktive Spezies (reactive species - RS) werden Moleküle bezeichnet, die aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen die Fähigkeit haben, anderen Atomen oder Molekülen ihre Elektronen zu entziehen, um Elektronenpaare zu bilden. Die Moleküle, die ihre Elektronen verlieren, werden oxidiert. Jene Moleküle, die die Elektronen aufnehmen, werden reduziert. Somit werden diese Reaktionen als Redoxreaktionen bezeichnet (22,23).

Zu den reaktiven Spezies gehören unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species (ROS)) und reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species (RNS)). RS können weiter in freie Radikale und Nicht-Radikale eingeteilt werden (5). Als freie Radikale werden alle Moleküle bezeichnet, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (5,24,25). Zu den freien Radikalen der ROS zählen zum Beispiel das Superoxid- bzw. Hyperoxid-Anion/Radikalanion ($O_2^{\cdot-}$) und das äußerst reaktive Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) (5,22,26–30). Zu den freien Radikalen der RNS zählen u. a. Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) sowie Stickstoffdioxid ($NO_2\cdot$), bei den Nicht-Radikalen sei als Beispiel Peroxinitrit ($ONOO^-$) genannt (5).

ROS entstehen bei vielen zellulären Vorgängen, die Sauerstoff benötigen. Dazu zählt etwa die mitochondriale Atmungskette (27,29). ROS entstehen auch physikalisch durch die Einwirkung von UV-Licht, Röntgen- oder Gammastrahlen (27) oder aber auch durch Hyperoxie bei tagelanger Beatmung mit reinem Sauerstoff (28). Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von ROS ist im Rahmen der sogenannten Fenton-Reaktion möglich. Hier wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches selbst nicht zu den Radikalen zählt (27,30), in Anwesenheit von Fe^{2+} in das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) gespalten (5,27,31).

Jede Gewebsschädigung, z.B. durch Sonneneinstrahlung oder auch durch Reperfusion nach Ischämie, führt zu einer Erhöhung der reaktiven Verbindungen (5,28). Als Gründe werden die Schädigungen der Mitochondrien oder ein Defizit von Antioxidantien wie etwa der Plasma-Thiole (s. Kapitel 1.4) bei erhöhtem Verlust von extrazellulären Flüssigkeiten diskutiert (5).

Reaktive Spezies sind für Schäden an vielen Biomolekülen verantwortlich. Sie führen beispielsweise zu Strangbrüchen und Mutationen in der DNS (5,25,27,28). Diese sind

mitverantwortlich für das beschleunigte Altern von Zellen (28,29) und die Entstehung von Krebs (25,32). Ebenso kann die Struktur und Funktion von Proteinen durch die Oxidation freier Thiol- (SH-) Gruppen zu Disulfiden (S-S-) beeinflusst werden (5,27,28). Das Hydroxyl-Radikal hat die Fähigkeit, die Fettsäuren in der Zellmembran der Erythrozyten zu vernetzen und so den Aufbau und die Funktion der Lipiddoppelschicht zu stören (26,28). ROS spielen zusätzlich eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose, da sie Low Density Lipoprotein (LDL) oxidieren. Makrophagen nehmen das oxidierte LDL (oxLDL) auf und werden zu Schaumzellen (5).

Es muss aber auch darauf hingewiesen werden, dass RS einige wichtige Rollen im Körper übernehmen. So werden sie in phagozytierenden Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen, beim sog. oxidative burst in großen Mengen erzeugt, um die zuvor aufgenommenen Keime abzutöten (5,33). ROS haben ebenso einen Einfluss auf die Immunaktivierung, indem sie zum Beispiel die Synthese von IL-8 stimulieren und so Neutrophile Granulozyten anlocken. Eine weitere Rolle von RS ist ihre Schlüsselfunktion in der intrazellulären Signaltransduktion (Reaktion der Zelle auf Hormone oder Wachstumsfaktoren) sowie beim interzellulären signaling (interzelluläre Kommunikation durch Stickoxid und Zytokine). Diese Regulationsmechanismen basieren auf der Oxidation und Reduktion von Thiolgruppen, oder der Oxidation bzw. Reduktion von Eisen-Ionen (5).

1.2.1 Antioxidative Strategien

Der Körper hat einige Strategien um der übermäßigen Bildung von ROS entgegenzuwirken. Man kann sie in enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen einteilen (27).

Enzyme stellen die wichtigsten antioxidativen Mechanismen dar. Die Superoxiddismutasen (SODs) (5,30) wandeln zwei Superoxid- bzw. Hyperoxid-Radikalanionen ($O_2^{\cdot-}$) in Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um (5). Wasserstoffperoxid wird durch Katalasen (5,30) und Glutathionperoxidasen (GPx) (5,27) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgewandelt. Im Fall der Glutathionperoxidasen wird H_2O_2 reduziert und Glutathion (GSH) oxidiert, sodass Glutathion-Disulfid (GSSG) entsteht (s. Abbildung 6). Dieses steht nach einer Reduktion durch die Glutathion-Reduktase wieder zur Verfügung (5,26,27,34). Glutathion ist bei intrazellulären Konzentrationen von 0,5-10 mmol/l das wichtigste Antioxidans des menschlichen Organismus (35).

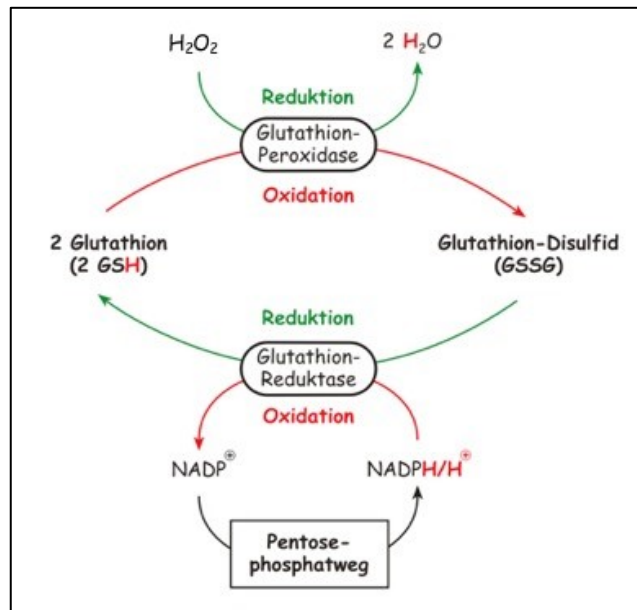


Abbildung 6: Glutathion als Antioxidans, adaptiert (26); Glutathion verfügt in reduzierter Form über die Thiolgruppe (-SH) und wird deshalb als GSH abgekürzt (34).

Nicht enzymatische Strategien beruhen unter anderem auf den Wirkungen von Vitamin C und E, auf die hier nicht weiter eingegangen wird (5,27,28). Als extrazelluläres Antioxidans spielt Albumin (s. Kapitel 1.3) eine wichtige Rolle. Es ist in der Lage, Eisen- und Kupfer-Ionen zu binden. Dies verhindert die oben genannte Fenton-Reaktion. Zusätzlich verfügt Albumin im Fall des humanen Mercaptalbumin (HMA) über eine freie Thiolgruppe (siehe 1.3), die Hydroxylradikale binden kann (36).

1.2.2 Oxidativer Stress

Die klassische Definition von oxidativem Stress ist laut Sies ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien, was Schäden als potentiell mögliche Folge hat (37). Diese Definition wurde von Sies und Jones aktualisiert und um die möglichen Störungen im Redox-Signaling und der Redox-Kontrolle ergänzt (38).

Oxidativer Stress wird bei vielen akuten bzw. chronischen Krankheiten/Störungen zumindest mitverantwortlich für deren Entstehung gemacht (39), darunter rheumatoide Arthritis, AIDS und zystische Fibrose (5). Es wurde nachgewiesen, dass auch Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind (20,40). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen weiter fortgeschrittenen Stadien der CKD und erhöhten Anteilen der oxidierten Formen von Albumin besteht (41,42). Ursächlich für den erhöhten oxidativen Stress sind eine reduzierte Funktion der antioxidativen Ressourcen durch eine verminderte Konzentration von

Glutathion, Vitamin-C und E sowie ein Selenmangel. Zusätzlich besteht durch das meist fortgeschrittene Alter, chronische Entzündungen, Urämie und verminderte Biokompatibilität von Dialyse-Membranen und Dialysatlösung eine erhöhte oxidative Aktivität (40). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Hämodialyse-Behandlung den Redoxzustand des Albumins in Richtung des HMAs verändert (43).

Thiole und Disulfide werden ebenso durch oxidativen Stress beeinflusst (siehe Kap. 1.4) Himmelfarb *et al.* untersuchten die Auswirkung einer Hämodialyse-Behandlung auf den Redox-Status der Aminothiole. Sie stellten fest, dass bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz die Plasma-Konzentration von oxidierten Amino-Thiolen erhöht ist. Eine Hämodialyse-Behandlung konnte die normalen Konzentrationen der Plasma-Thiole wiederherstellen (44,45). Es ist daher möglich, dass die oxidierten Formen der Amino-Thiole für eine Urämie mitverantwortlich sind (45). Weiters wird vermutet, dass ein niedermolekulares Toxin existiert, welches für die Plasma-Protein-Oxidation verantwortlich ist und durch eine HD-Behandlung entfernt werden kann (44).

1.3 Albumin

Blut besteht aus einem zellulären und einem flüssigen Anteil. Der zelluläre Anteil setzt sich aus Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zusammen. Im flüssigen Anteil des Blutes stellt das Protein Albumin mit einer Konzentration von über 4,5 g/dl im Menschen die Hauptkomponente dar (1,46,47). Es wird in der Leber in den Hepatozyten gebildet (47) und über unterschiedliche Wege abgebaut und ausgeschieden, unter anderem über die Niere, die Leber und die Haut (46,48). Die Hauptfunktionen des Albumins bestehen in der Erhaltung des kolloidosmotischen Drucks und des Transports hydrophober Substanzen wie etwa Bilirubin, Vitamine, langkettige freie Fettsäuren oder bestimmte Medikamente (5,46,48).

Die Normwerte von Albumin im Blutserum liegen bei einem Erwachsenen zwischen 35 und 50 g/l (48). Verminderte Werte (=Hypalbuminämie) können Hinweise auf eine erhöhte Ausscheidung durch eine Schädigung der Nieren bzw. Leber oder entzündliche Erkrankungen sein (4,48). Eine Hypalbuminämie führt zu einem vermehrten Übertritt von Wasser in den interzellulären Raum und somit zu interstitiellen Ödemen (6,46).

Humanalbumin besteht aus 585 Aminosäuren (48) und hat eine molare Masse von 66 kDa. Von den zwanzig proteinogenen Aminosäuren ist 35-mal Cystein vertreten (48,49).

Während 34 der Cysteinreste mittels Disulfidbrücken (S-S) Cystin-Paare bilden (s. Kap.1.4) und so dem Albuminmolekül zu seiner räumlichen Struktur verhelfen, hat das Cystein an vierunddreißigster Stelle der Proteinsequenz eine endständige, freie Thiol- oder auch Mercaptogruppe (-SH) (5,48). Diese kann mit anderen Thiolen und manchen Oxidationsmitteln kovalente Bindungen eingehen (48). So reagiert sie etwa schnell mit dem Peroxyl-Radikal (RO_2^\cdot) sowie dem Alkoxy-Radikal (RO^\cdot) und langsam mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (5).

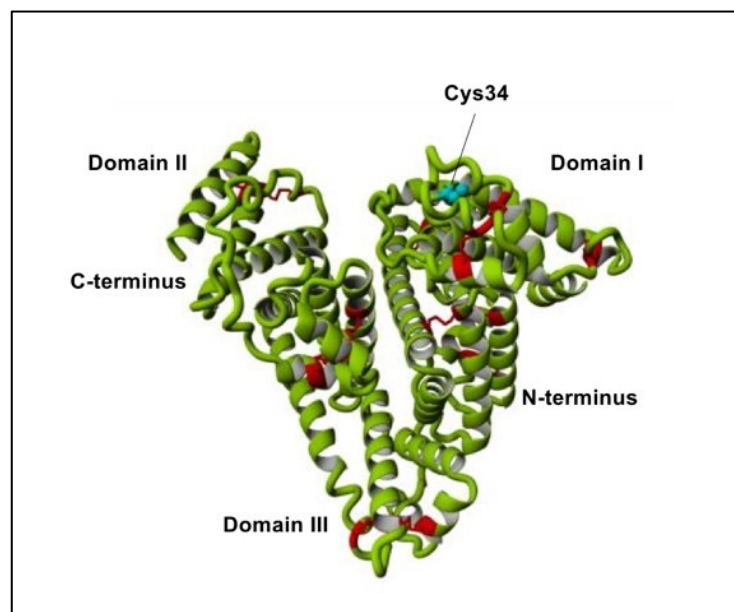


Abbildung 7: Drei-Dimensionale Struktur von Albumin mit hervorgehobenem Cys-34 (74)

Abhängig vom Oxidationszustand des Cys-34 kann humanes Serumalbumin in drei verschiedene Formen eingeteilt werden. Die reduzierte Form des Albumins enthält die freie -SH-Gruppe und wird als humanes Mercaptalbumin (HMA) bezeichnet. Es liegt zu 70-80% vor. Eine mild bzw. reversibel oxidierte Form liegt zu etwa 25% vor und wird humanes Non-Mercaptalbumin-1 (HNA-1) genannt. In diesem Fall bildet das Cystein-34 eine Disulfidbrücke mit anderen Thiolen, wie zum Beispiel Cystein, Gluthathion oder Homocystein (siehe Kapitel 1.4) (50,51).

Am weitaus häufigsten wird die Disulfidbrücke mit Cystein gebildet (52). Wird das Cystein-34 noch höher zur Sulfin- ($-\text{SO}_2\text{H}$) oder Sulfonsäure ($-\text{SO}_3\text{H}$) oxidiert, liegt humanes Non-Mercaptalbumin-2 (HNA-2) vor. Es handelt sich dabei um eine irreversibel oxidierte Form, deren Anteil bei gesunden Erwachsenen nur gering ist (50,51). Durch das freie Cystein-34 ist Albumin mit bis zu $500 \mu\text{M}$ an den Plasma-Thiolen beteiligt (5) und liefert so den

höchsten Anteil der freien Thiol-Gruppen im Plasma (50,52). Dies führt dazu, dass Albumin anfällig für die Auswirkungen von oxidativem Stress im Plasma ist (36,53).

1.4 Thiole und Disulfide

Thiole entsprechen Alkoholen, bei denen im Molekül der Sauerstoff durch ein Schwefel-Atom ersetzt ist (R-S-H) (23). Sie werden daher auch als Thioalkohole bezeichnet (22). Im Körper unterscheidet man Thiole mit niedrigem und hohem molekularem Gewicht. Zu den Thiolen mit niedrigem Gewicht, sog. low-molecular-weight thiols (LMW-SH), gehören Cystein (Cys), Homocystein (Hcys), Glutathion (GSH) und Cysteinylglycin (CysGly). Sie liegen in reduzierter Form und als Disulfide (s.u.) vor. Die Disulfidbildung kann einerseits zwischen zwei LMW-SH und andererseits zwischen einem LMW-SH und der SH-Gruppe eines Proteins erfolgen. Letztere werden als gemischte Disulfide bezeichnet (52,54). Zu den Thiolen mit hohem molekularem Gewicht gehört zum Beispiel Albumin (52).

Extrazellulär kommt Cystein am häufigsten vor, jedoch wird hier der größte Anteil der freien Thiole von Protein-gebundenen SH-Gruppen gebildet (54). Intrazellulär liegt am häufigsten Glutathion vor (52).

Werden zwei Thiole mild oxidiert, kommt es unter Abspaltung von zwei Protonen und zwei Elektronen zur Ausbildung einer Disulfidbrücke (siehe Abbildung 8). Im Fall der Aminosäure Cystein ist dies essentiell für die räumliche Struktur (22,25,55) und Funktion von vielen Proteinen, weil durch die Brückenbildung weit entfernte Teile der Proteinkette verbunden werden können (22). Proteine können aber, wie oben beschrieben, ihre Struktur und Funktion durch die Bildung von Disulfidbindungen verlieren.

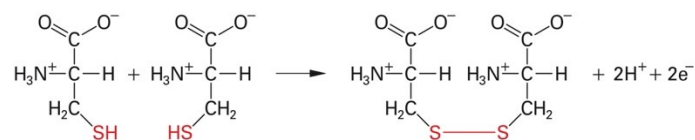


Abbildung 8: Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen zwei Cystein-Molekülen nach (22)

1.5 Ziel der Diplomarbeit

Das Ziel der Studie ist, die Redoxzustände des Albumins und die Konzentration der niedermolekularen Thiole im Plasma zu untersuchen und einen eventuellen Zusammenhang zu erforschen. Durch die Messung der Blutproben vor und nach der Dialyse ergibt sich die

Möglichkeit einer Beobachtung der Veränderung des Albumins und der Plasmathiole in Abhängigkeit der Behandlungsmethode. Während andere Studien die Gesamt-Thiole im Plasma untersuchen (56), sollen im Unterschied dazu bei der hier vorliegenden Studie die Plasma-Thiole und Disulfide gemessen werden. Dass eine HD-Behandlung auf die Redoxzustände von Albumin einen Einfluss hat, wurde bereits erforscht. Ebenso wurden die Auswirkungen auf die Plasma-Thiol Konzentration untersucht. Gemeinsame Messungen beider Zielgrößen wurden bis dato noch nicht durchgeführt.

2 Studiendesign, Rekrutierung und Methoden

Für die hier vorgestellte Pilotstudie liegt ein positives Votum der Medizinischen Universität Graz vor (EK-Nummer 28-319 ex 15/16). Die Rekrutierung der Patientinnen und Patienten und die Probennahme erstreckten sich vom Frühling 2016 bis Herbst 2016. Die Ein- und Ausschlusskriterien für diese Studie wurden durch ein Screening aller Patientinnen und Patienten, die in diesem Zeitraum an der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik für Innere Medizin des LKH Graz mit Hämodialyse und Hämodiafiltration behandelt wurden, überprüft.

Eingeschlossen wurden Patientinnen und Patienten mit chronischem Nierenversagen unter Dialysetherapie, Albuminwerten im Normbereich (3,5 – 5,3 g/dl), Leberwerten geschlechtsabhängig im Normbereich, CRP \leq 50 mg/l und einer Restdiurese von $<$ 500 ml/24h. Nach diesen Kriterien wurden 21 Patientinnen und Patienten rekrutiert und mündlich und schriftlich vom ärztlichen Personal über die Studie aufgeklärt. Zwanzig Personen gaben anschließend mit dem Informed Consent-Formular ihre schriftliche Einwilligung. Die Patientinnen und Patienten erschienen zu drei Dialysetherapien/Woche, wobei die Blutabnahmen jeweils nach dem langen Dialyseintervall erfolgten.

Der eingesetzte Dialysator aller Patientinnen und Patienten war ein Polyflux™ 210H der Firma GAMBRO® mit einer Polyamix™-Membran aus Polyarylethersulfon, Polyvinylpyrrolidon und Polyamid (57). Hauptzielgrößen für die Pilotstudie waren die Redox-Zustände von Albumin, sowie die Konzentrationen der Thiole und Disulfide im Plasma. Zusätzlich wurden bei der Blutabnahme vor der Dialyse mit einem Automaten der Firma SYSMEX® (Gerät KX-21N™) ein Blutbild und mit Geräten der Firma EUROlyser® (Eurolyser smart für die Bestimmung von HbA1c bzw. CRP, Vollautomat) Routinelaborwerte gemessen.

2.1 Albumin

2.1.1 Materialgewinnung

Für die Analyse der Redoxzustände von Albumin wurde den Patientinnen und Patienten vor und vier Stunden nach Beginn der Dialysebehandlung ein 4,5 ml VACUETTE® RÖHRCHEN (K₃EDTA mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgte aus dem Schlauchsystem, in welchem das Blut der Patientinnen und Patienten zur Dialyse- bzw. Hämodialysemaschine fließt. Die Proben wurden bei 2500 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

2.1.2 Analyse

Die Bestimmung des Redoxzustands von Albumin erfolgte durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gemäß dem Protokoll von Era *et al.* (58). Mit dieser Methode ist es möglich, Albumin nach seinem Redoxzustand in die freie Sulfhydryl-Form (HMA), das gemischte Disulfid (HNA-1) und die höher oxidierte Form (HNA-2) aufzutrennen. Sämtliche HPLC-Messungen wurden von Frau Doris Payerl am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Die Plasma-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:100 mit Probenpuffer (0,1 M Natriumphosphat, 0,3 M Natriumchlorid, pH 6,87) auf ein Endvolumen von 1 mL verdünnt und anschließend durch einen Whatman 0,45 µm Nylon-Filter (Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) gefiltert.

20 µL des oben genannten Filtrats wurden in das HPLC-System, bestehend aus einer Merck-Hitachi L2130 Gradientenpumpe (VWR, Wien), einem Shimadzu SIL-20AC Autosampler, einem Shimadzu CTO Säulenofen (Shimadzu Austria, Wien) und einem Jasco 821-FP Fluoreszenz Detektor (Spectronex, Wien), injiziert und über eine Anionenaustauschsäule (Shodex Asahipak ES-502N 7C, 7.5 x 100 mm, Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) mit einer mobilen Phase (50 mM Natriumacetat, 400 mM Natriumsulfat, pH 4,85) getrennt. Während der Analyse wurde die Temperatur der Säule kontinuierlich auf 35°C gewärmt. Die Eluierung erfolgte mittels eines Ethanolgradienten von 0 – 6 % und einer Flussrate von 1 ml/min. Hierfür wurden zwei Laufmittel (Laufmittel A (Phosphatpuffer) und Laufmittel B (Laufmittel A + 10% Ethanol)) wurden laut nachfolgendem Schema eingesetzt.

Tabelle 1: Laufmittelzusammensetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Analyse der Redoxzustände von Albumin mittels HPLC.

0 min	Laufmittel A 100 %
5 min	Laufmittel A 100 %
25 min	Laufmittel A 40 %, Laufmittel B 60 %
30 min	Laufmittel A 40 %, Laufmittel B 60 %
35 min	Laufmittel A 100 %
40 min	Laufmittel A 100%

Für die Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt (Extinktionswellenlänge 280 nm, Emissionswellenlänge 340 nm).

Sämtliche Ergebnisse der Albuminfraktionen beider Behandlungsverfahren wurden als eine Gesamtgruppe zusammengefasst und auf einen signifikanten Unterschied überprüft. Ebenso wurden beide Behandlungsverfahren separat auf einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Albuminfraktionen untersucht.

2.2 Thiole

2.2.1 Materialgewinnung

Patientinnen und Patienten mit HD/HDF wurde unmittelbar vor der Dialyse und vier Stunden nach Beginn der Dialyse je 8 ml Blut abgenommen. Die Abnahme erfolgte in 8 ml VACUETTE® RÖHRCHEN (Z Serum Gerinnungsaktivator, Greiner Bio-one) aus dem Schlauchsystem, in welchem das Blut der Patientinnen und Patienten zur Dialysemaschine fließt.

2.2.2 Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll von Jones und Liang (59). Unmittelbar nach der Blutabnahme wurden 1350 µl Vollblut in vorbereitete Eppendorf-Gefäße mit 150 µl einer Boratpuffer-Stocklösung (0,53 g L-Serin, 25 mg Heparin (Natrium-Salz), 50 mg Bathophenantrolindisulfonsäure (BPDS) und 300 mg Iodessigsäure auf 10ml Boratpuffer (0,5 M) mit Gamma-Glutamylglutamat (γ -EE) als Internem Standard (IS) überführt.

Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert und 200 µl des Überstands in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt, welches 200 µl einer 10%

Perchlorsäurelösung mit Borsäure (0,2 M) enthielt. Diese Aliquots wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.3 Derivatisierung der Proben

Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und danach für zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. 300 µl des Überstands wurden abgehoben, der pH-Wert mittels einer gesättigten Tetrahydroboratlösung mit KOH auf 9,0 +/- 0,2 eingestellt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 300 µl einer Lösung aus 200 mg Dansylchlorid auf 10 ml Aceton zugegeben und lichtgeschützt über Nacht inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 500 µl Chloroform zugegeben, gevortext und für zwei Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 20 µl in die HPLC injiziert.

2.2.4 Analyse

Für die Bestimmung der Thiole wurde ebenso die in Kapitel 2.1.2 beschriebene High Performance Liquid Chromatography eingesetzt. Die Analyse folgte einem adaptierten Protokoll von Jones und Liang (59). Die Adaption bestand in der Verwendung von Acetonitril anstelle von Methanol als Laufmittel. Sämtliche HPLC-Messungen wurden von Frau Doris Payerl am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Zwei Laufmittel, Laufmittel A (80% Acetonitril/dH₂O) und Laufmittel B (Acetat-gepufferte Acetonitrillösung; 640 ml Acetonitril, 200 ml Acetat Stocklösung, 125 ml Eisessig, 50 ml dH₂O, pH 4,6) wurden zu unterschiedlichen Gradienten eingesetzt.

Tabelle 2: Laufmittelzusammensetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Analyse der Thiole mittels HPLC.

0 min – 5 min	Laufmittel A 95%, Laufmittel B 5%
5 min – 35 min	Laufmittel A 20%, Laufmittel B 80%
35 min – 50 min	Laufmittel A 20%, Laufmittel B 80%
50 min – 52 min	Laufmittel A 95%, Laufmittel B 5%
52 min – 60 min	Laufmittel A 95%, Laufmittel B 5%

Die Flussrate betrug 1,0 ml. Die Detektion erfolgte mittels eines Fluoreszenzdetektors bei 335 nm / 518 nm (Ex/Em). Die Säulentemperatur betrug 25°C.

2.3 Statistische Analyse

Für die deskriptive Analyse der PatientInnengruppe wurden Mittelwerte, Standardabweichung, Ranges und Prozentrechnungen verwendet. Nach erfolgter Testung auf Normalverteilung wurde ein nicht-parametrischer Test (Wilcoxon-Test) für die Prüfung der Unterschiedshypothesen für die Werte vor und nach der Dialyse gewählt (60,61). Gruppenunterschiede zwischen den Behandlungsmethoden Hämodialyse und Hämodiafiltration wurden mit Mann-Whitney U Tests (61) untersucht.

Abschließend wurden Korrelationen zwischen den Ausgangswerten und Verschiebungen der Albuminfraktionen und den Variablen Alter und Geschlecht als Einflussfaktoren berechnet. Auch für die Leber betreffende Werte (γ -Glutamyltransferase = GGT, Aspartat-Aminotransferase = AST, Alanin-Aminotransferase = ALT) wurden Spearman Korrelationsanalysen mit den Verschiebungen der Albuminfraktion durchgeführt (60). Für alle Datenanalysen wurde die Software SPSS (Version 24, 2016, IBM) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Patientinnen und Patienten

Für die Studie wurden 20 Patientinnen und Patienten vor und nach einer Hämodialyse bzw. Hämodiafiltration untersucht. Von den rekrutierten 20 Patientinnen und Patienten gab es keine Ausfälle, es konnten somit vollständige Datensätze von allen Teilnehmenden in die statistische Analyse einbezogen werden. Die Probandengruppe setzte sich aus zwölf Frauen (60 %) und acht Männern (40 %) zusammen. Das Durchschnittsalter betrug 58 Jahre (SD 16,40; Range 23 - 82). Mit einer Hämodialyse wurden elf (55%) der Patientinnen und Patienten behandelt und neun (45%) unterzogen sich einer Hämodiafiltration.

Bezüglich der Laborwerte wurden vor der Dialyse unter anderem das Gesamtprotein, das Albumin sowie das Kreatinin gemessen. Die Ergebnisse sind in den beiden nachfolgenden Tabellen dargestellt. Wie bei Dialysepatienten zu erwarten, zeigten sich durchwegs erhöhte Kreatininwerte.

Tabelle 3: Mittelwerte von Gesamtprotein und Albumin der Gesamtgruppe der Studie sowie in Abhängigkeit des Behandlungsverfahrens:

<i>Referenzbereich</i>	<i>Gesamtprotein</i> 6,5 – 8,5 g/dl (62)	<i>Albumin</i> 3,5 – 5,3 g/dL (63)
<i>Gesamtgruppe</i>	6,56 ± 0,45	4,88 ± 0,55
<i>HD</i>	6,42 ± 0,50	4,80 ± 0,54
<i>HDF</i>	6,73 ± 0,35	4,98 ± 0,57

Tabelle 4: Mittelwerte des Kreatinins der Patientinnen und Patienten der Studie:

	<i>Kreatinin</i>	<i>Referenzbereich (63)</i>
<i>Frauen</i>	8,03 ± 2,98	< 1,00 mg/dL
<i>Männer</i>	7,84 ± 3,66	< 1,21 mg/dL

3.2 Ergebnisse der HPLC-Messungen der Albuminfraktionen

3.2.1 Chromatogramme

Durch die HPLC entstandene Chromatogramme ermöglichen eine qualitative und quantitative Auswertung. Jede der Albuminfraktionen wird durch einen eigenen Peak dargestellt. Die Quantifizierung basiert auf der Fläche unter den verschiedenen Peaks und wird über Gauß'sche Funktionen berechnet.

In Abbildung 9 sind am Beispiel von Patientin Nr. 18 zwei für die Methode typische Chromatogramme vor (blau) und nach (rot) der Dialyse dargestellt. Während die Fraktionen von HMA und HNA-1 im Sinne einer annähernden baseline separation sehr gut getrennt ausgebildet sind und so eine gute Quantifizierung ermöglichen, ist die Auswertung von HNA-2 durch seine geringe Menge und dementsprechende geringe Peak-Bildung nur erschwert möglich. Die Verschiebung des HNA-2-Peaks in Richtung des Peaks von HNA-1 entspricht einer schlechteren Auftrennung und erschwert die Analyse zusätzlich. Im Gegensatz zum HNA-1-Peak ist der HMA-Peak nach der Dialyse deutlich höher ausgebildet als davor.

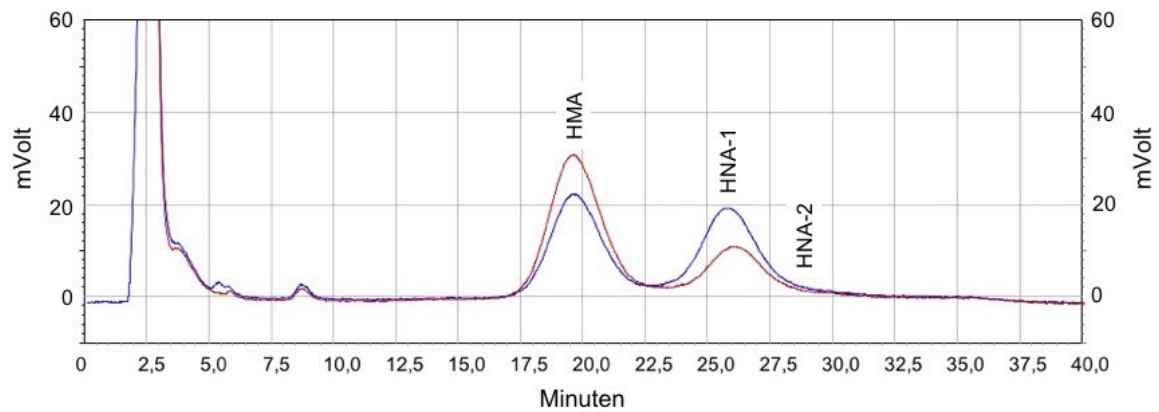


Abbildung 9: Typische HPLC-Chromatogramme am Beispiel von Patientin Nr.18 vor (blau) und nach (rot) der Dialyse

3.2.2 Statistische Auswertung

Um die Änderung der Albuminfraktionen auf ihre Signifikanz zu überprüfen, wurde zuerst eine Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Eine Normalverteilung konnte damit nicht ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wurden Histogramme für die einzelnen Albuminfraktionen erstellt. Die Messergebnisse folgen nicht eindeutig den Normalverteilungskurven, siehe beispielsweise die Histogramme der HMA-Fractionen in Abbildung 10.

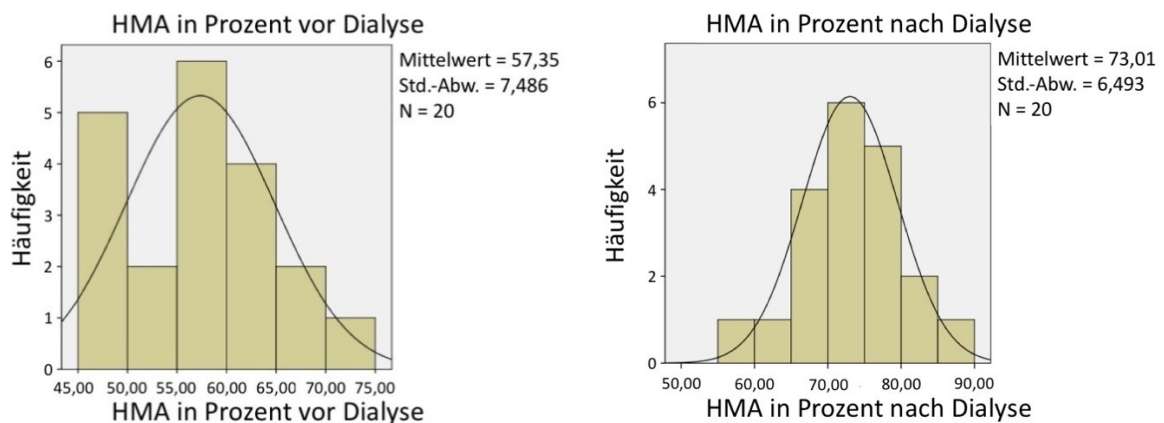


Abbildung 10: Histogramme der HMA-Fractionen vor und nach der Dialyse

Nachdem eine Normalverteilung durch beide Tests nicht sicher gegeben war, fiel die Entscheidung auf ein nicht-parametrisches Untersuchungsverfahren zur Testung des Unterschieds für verbundene Stichproben. Ein Wilcoxon-Test wurde für alle drei Albuminfraktionen durchgeführt.

Die Verteilung der HMA-Werte vor und nach der Dialyse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die HMA-Werte in Prozent waren nach der Dialyse signifikant höher (Median = 72,91) als davor (Median = 58,68; asymptotischer Wilcoxon-Test: $z = -3,92$, $p < 0,01$; $n = 20$).

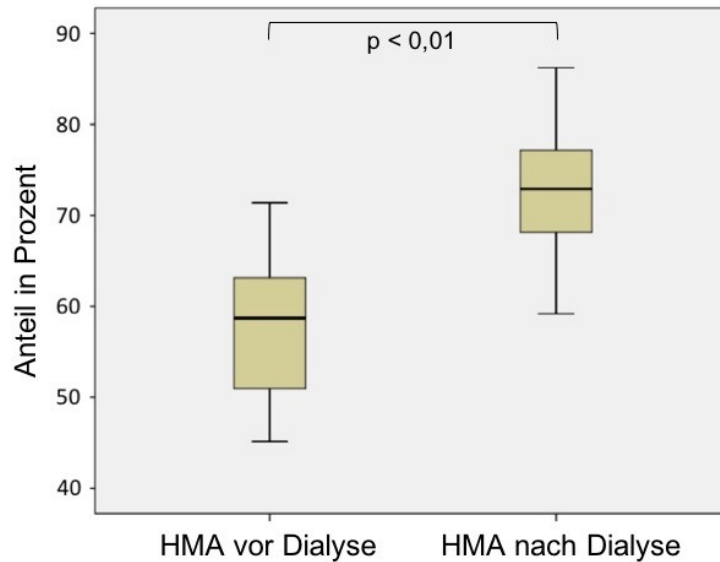


Abbildung 11: Boxplot von HMA in Prozent am Gesamalbumin vor und nach der Dialyse in der gesamten Gruppe ($n=20$)

Zur Überprüfung eines Unterschiedes zwischen den Behandlungsverfahren Hämodialyse und Hämodiafiltration wurde anschließend zweimal ein Mann-Whitney U Test durchgeführt. Wie in Tabelle 5 dargestellt, zeigten die HMA-Ergebnisse vor der Dialyse keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit Hämodialyse (Median 56) und der Gruppe mit Hämodiafiltration (Median 60). Auch nach der Dialyse zeigte sich für die HMA-Prozentwerte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit Hämodialyse (Median 72) und der Gruppe mit Hämodiafiltration (Median 77).

Tabelle 5: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HMA in Prozent am Gesamalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse ($n=11$), Hämodiafiltration ($n=9$) und der Gesamtgruppe ($n=20$)

	Hämodialyse ($n = 11$)	Hämodiafiltration ($n = 9$)	total ($n = 20$)	
	Median	Median	Median	Sig.(2-seitig)
HMA in % vor Dialyse	56	60	59	0,77
HMA in % nach Dialyse	72	77	73	0,20

Die Verteilung der HNA-1-Werte vor und nach der Dialyse sind nachfolgend in Abbildung 12 dargestellt. Die HNA-1-Werte in Prozent waren nach der Dialyse signifikant niedriger

(Median = 19,98) als davor (Median = 32,05; asymptotischer Wilcoxon-Test: $z = -3,92$, $p < 0,01$; $n = 20$).

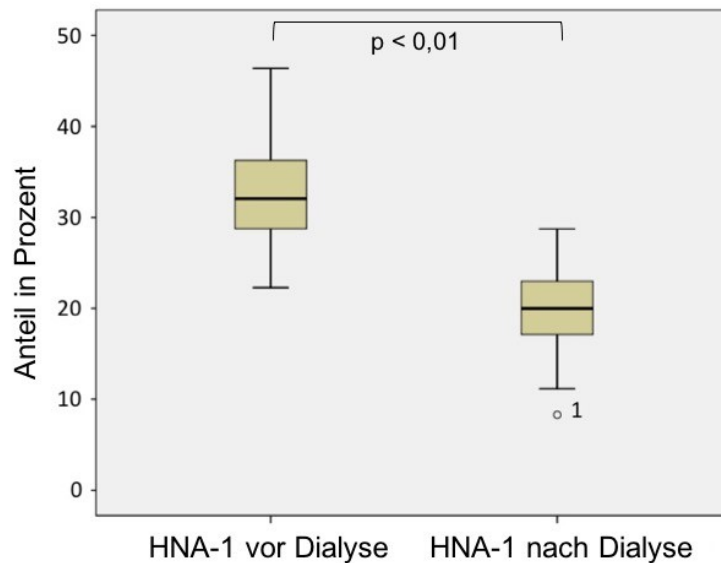


Abbildung 12: Boxplot von HNA-1 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach der Dialyse in der untersuchten Gruppe ($n=20$); 1... Ausreißer außerhalb des 1,5 – fachen Interquartilabstands

Anschließend wurden wieder Unterschiede zwischen den Behandlungsformen mittels Mann-Whitney U Tests überprüft. Tabelle 6 fasst die Ergebnisse für HNA-1 zusammen. Vor der Dialyse zeigte sich kein signifikanter Gruppenunterschied betreffend der HNA-1-Werte zwischen Patientinnen und Patienten, die mit Hämodialyse behandelt wurden (Median 33) und der Gruppe, die mit Hämodiafiltration behandelt wurden (Median 31). Auch nach der der Dialyse war kein signifikanter Unterschied der Prozentwerte für HNA-1 zwischen der Gruppe mit Hämodialyse (Median 21) und der Gruppe mit Hämodiafiltration (Median 18) nachweisbar.

Tabelle 6: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HNA-1 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse ($n=11$), Hämodiafiltration ($n=9$) und der Gesamtgruppe ($n=20$)

	Hämodialyse ($n = 11$)	Hämodiafiltration ($n = 9$)	total ($n = 20$)	
	Median	Median	Median	Sig.(2-seitig)
HNA-1 in % vor Dialyse	33	31	32	0,77
HNA-1 in % nach Dialyse	21	18	20	0,46

Die Verteilung der HNA-2-Werte vor und nach der Dialyse sind in Abbildung 13 dargestellt. Die HNA-2-Werte in Prozent waren nach der Dialyse signifikant niedriger (Median = 6,38) als davor (Median = 8,97; asymptotischer Wilcoxon-Test: $z = -3,21$, $p < 0,01$; $n = 20$).

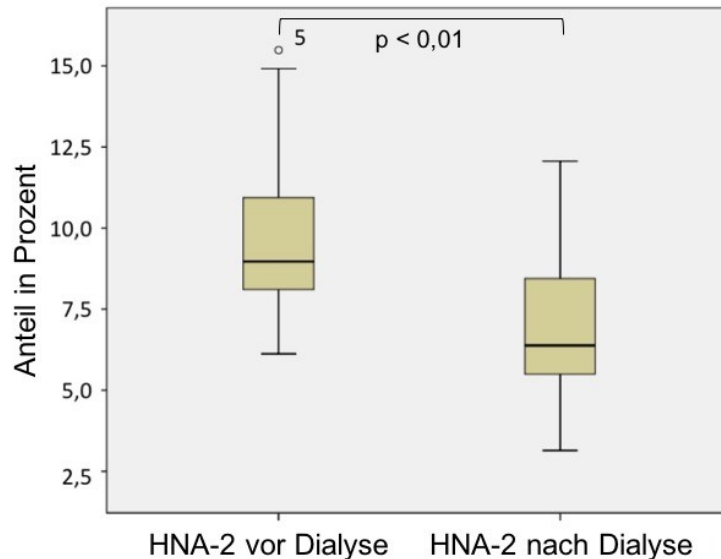


Abbildung 13: Boxplot von HNA-2 in Prozent am Gesamalbumin vor und nach der Dialyse in der untersuchten Gruppe ($n=20$); 5... Ausreißer außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands

Auch die HNA-2 Werte in Prozent am Gesamalbumin wurden hinsichtlich Gruppenunterschieden zwischen den beiden Behandlungsverfahren untersucht. Hierfür kamen wiederum zwei Mann-Whitney U Tests zum Einsatz. Wie in Tabelle 7 dargestellt, zeigten die HNA-2-Ergebnisse vor der Dialyse keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit Hämodialyse (Median 9) und der Gruppe mit Hämodiafiltration (Median 9). Nach der Dialyse zeigte sich für die HNA-2-Prozentwerte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Hämodialyse behandelten Gruppe (Median 7) und der Gruppe, die mit Hämodiafiltration behandelt wurde (Median 6).

Tabelle 7: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HNA-2 in Prozent am Gesamalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse ($n=11$), Hämodiafiltration ($n=9$) und der Gesamtgruppe ($n=20$)

	Hämodialyse ($n = 11$)	Hämodiafiltration ($n = 9$)	total ($n = 20$)	
	Median	Median	Median	Sig.(2-seitig)
HNA-2 in % vor Dialyse	9	9	9	0,88
HNA-2 in % nach Dialyse	7	6	6	0,13

Mit zwei Korrelationsanalysen wurde anschließend überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Variablen Alter und Geschlecht und den Ausgangswerten des

Gesamtalbumins für HMA, HNA-1 und HNA-2 in Prozent besteht. Wie aus Tabelle 8 und Tabelle 9 ersichtlich, zeigten sich hierbei keine signifikanten Korrelationen.

Tabelle 8: Korrelationsanalyse für die Variable Alter und die Ausgangswerte der drei Albuminfraktionen in Prozent am Gesamtalbumin.

Variable	Alter
HMA Ausgangswert	0,105
HNA-1 Ausgangswert	- 0,159
HNA-2 Ausgangswert	0,018

Tabelle 9: Korrelationsanalyse für die Variable Geschlecht und die Ausgangswerte der drei Albuminfraktionen in Prozent am Gesamtalbumin.

Variable	Geschlecht
HMA Ausgangswert	0,142
HNA-1 Ausgangswert	- 0,124
HNA-2 Ausgangswert	- 0,035

Zusätzlich wurden nicht-parametrische Korrelationsanalysen durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Verschiebungen in den Albuminfraktionen und dem Verfahren, sowie dem Alter und dem Geschlecht der Patientinnen und Patienten festzustellen. Hierfür wurden die Differenzen zwischen HMA, HNA-1 und HNA-2 in Prozent vor und nach der Dialyse berechnet. Diese Differenzen zeigten weder zur Variable Verfahren (Tabelle 10), noch zur Variable Alter (Tabelle 11) bzw. Geschlecht (Tabelle 12) eine signifikante Korrelation.

Tabelle 10: Korrelationsanalyse für die Variable Verfahren und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.

Variable	Verfahren
HMA-Verschiebung	0,322
HNA-1-Verschiebung	-0,305
HNA-2-Verschiebung	-0,253

Tabelle 11: Korrelationsanalyse für die Variable Geschlecht und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.

Variable	Geschlecht
HMA-Verschiebung	0,177
HNA-1-Verschiebung	- 0,142
HNA-2-Verschiebung	- 0,177

Tabelle 12: Korrelationsanalyse für die Variable Alter und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.

Variable	Alter
HMA-Verschiebung	- 0,213
HNA-1-Verschiebung	0,310
HNA-2-Verschiebung	- 0,080

Abschließend wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Verschiebungen der Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse und den Leberwerten GGT, AST und ALT überprüft. Hierfür zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Leberwerten und den Verschiebungen der Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse, siehe Tabelle 13.

Tabelle 13: Korrelationsanalyse für die Variablen GGT, AST und ALT und die Verschiebungen der Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse

Variable	GGT	AST	ALT
HMA-Verschiebung	- 0,008	0,047	0,138
HNA-1-Verschiebung	0,032	- 0,134	- 0,012
HNA-2-Verschiebung	0,027	0,128	- 0,131

3.3 Ergebnisse der HPLC-Messungen der Plasma-Thiole

3.3.1 Chromatogramme

Zur Analyse der Plasmathiole wurde das Protokoll von Jones und Liang adaptiert und Acetonitril anstelle von Methanol als Laufmittel eingesetzt. Durch die HPLC werden die Gesamt-Thiole im Plasma in ihre einzelnen Thiole aufgetrennt, was zu einem Chromatogramm führt, in dem jeder Peak eines der Thiole darstellt. So wird eine qualitative und quantitative Auswertung der einzelnen Thiole/Disulfide ermöglicht. Gemessen wurden: Cystin, Homocystein, Cystein, Cysteinyl-Glycin (CYS-GLY), Cysteinyl-Glutathion-Disulfid (CYSSG), Glutathion (GSH) und Glutathion-Disulfid (GSSG). Als interner Standard für die Quantifizierung wurde Gamma-Glutamylglutamat (γ -EE (IS)) eingesetzt. Die Quantifizierung basiert auf der Fläche unter den einzelnen Peaks und wird mittels Gauß'scher Funktionen berechnet.

Es folgt ein Chromatogramm mit Acetonitril als Laufmittel. Zu beobachten sind hier zusätzliche Peaks sowie eine Verschiebung des Cystin-Peaks nach links in Richtung der Laufmittelfront. Zur Kontrolle des internen Standardmix wurde die Messung ebenso mit Methanol als Laufmittel durchgeführt (s. Abbildung 15). Bei der Verwendung von Methanol ist sowohl eine gute Auftrennung als auch eine gute Peak-Bildung der einzelnen Thiole/Disulfide zu sehen. Jedoch ist die Peakreihenfolge verändert und beim Peak des internen Standards kommt es zu einer Koeluierung mit einer anderen Verbindung.

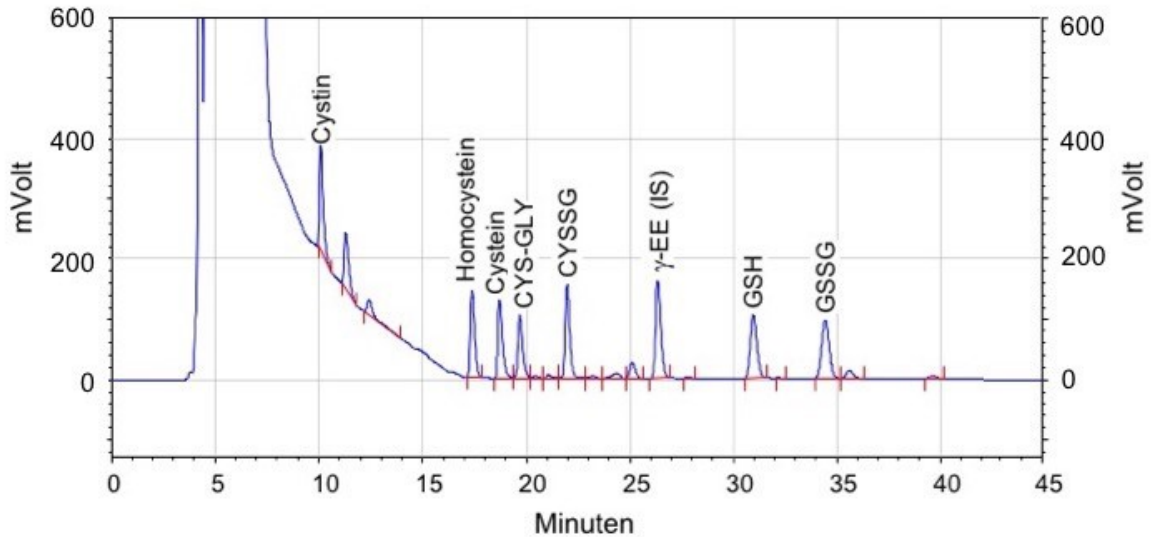


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm des Standardmix mit Acetonitril als Laufmittel. Zusätzliche Peakbildungen sowie eine Verschiebung des Cystin-Peaks in Richtung der Laufmittelfront erschweren die weitere Auswertung

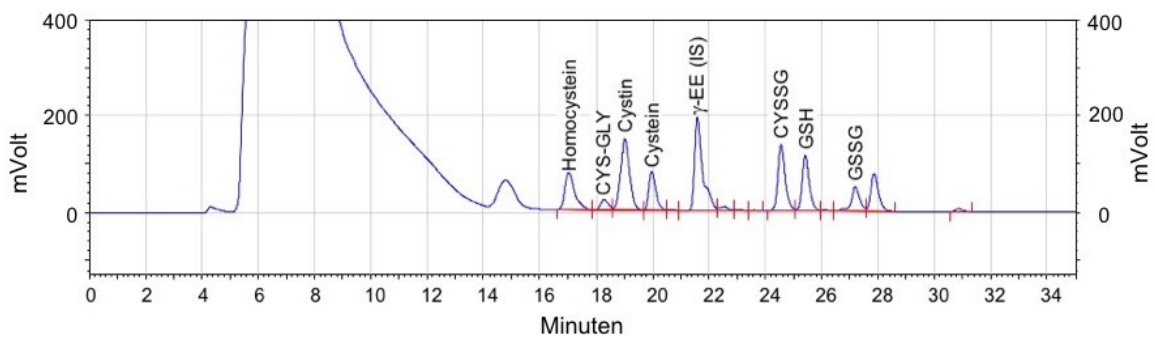


Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm des Standardmix mit Methanol als Laufmittel. Es zeigt sich eine gute Peakbildung, jedoch ist die Reihenfolge der Peaks im Vergleich zum Chromatogramm mit Acetonitril verändert. Beim Peak des internen Standards (γ -EE (IS)) kommt es zu einer Koelution mit einer anderen Verbindung.

Im Folgenden wurden die Proben von einem gesunden Probanden (s. Abbildung 16) und einer Patientin (s. Abbildung 17) mittels Acetonitril aufgetrennt, was zu den nachfolgenden Chromatogrammen führte. Es zeigt sich in beiden Fällen eine schlechte Auftrennung der einzelnen Thiol-/Disulfid-Verbindungen und eine Linksverschiebung der Peaks in Richtung der Laufmittelfront. Eine weitere Auswertung ist somit unmöglich.

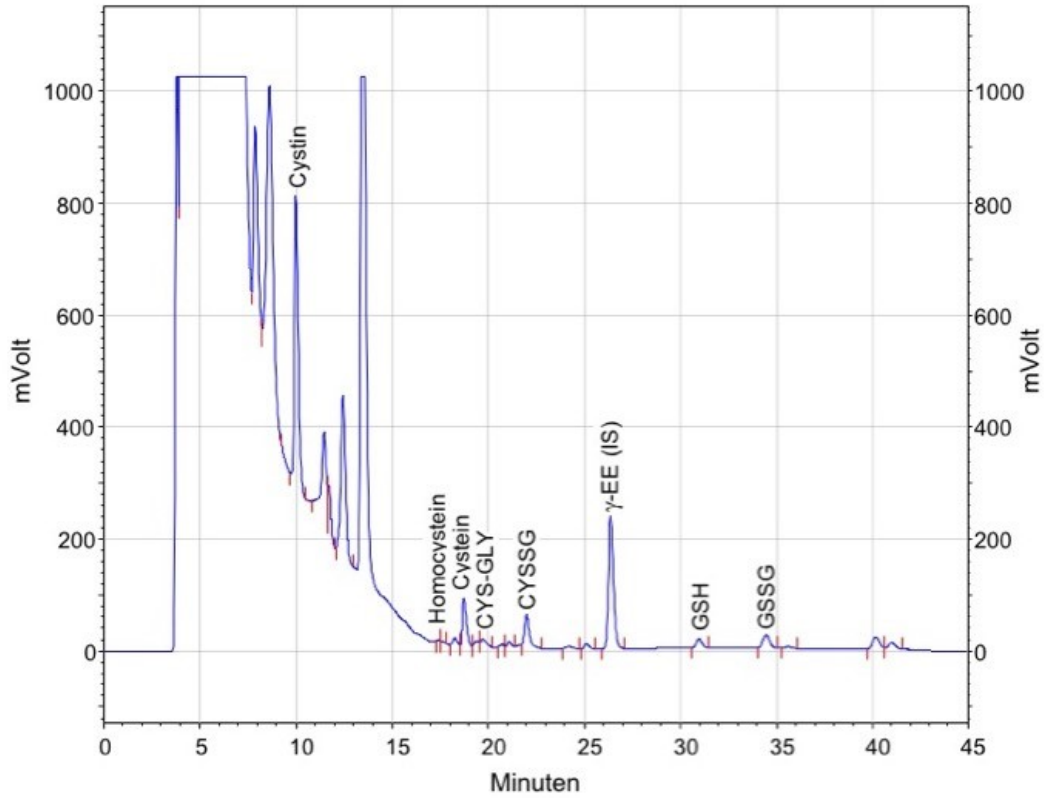


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm eines gesunden Probanden mit Acetonitril als Laufmittel

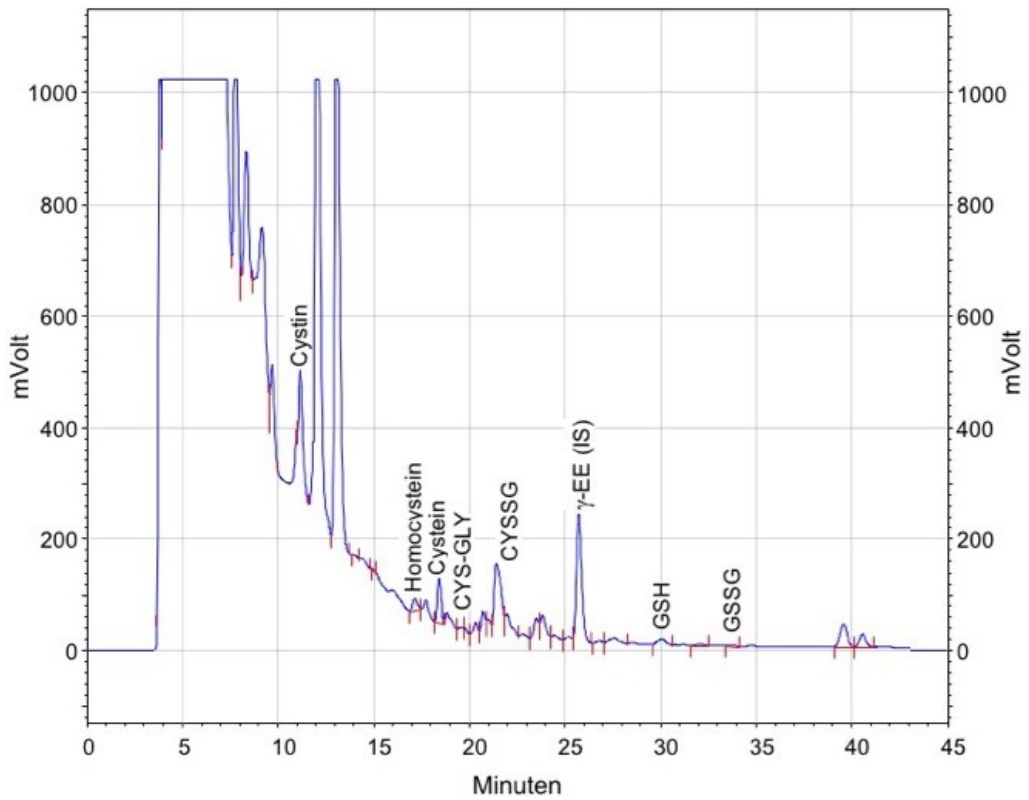


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von Patientin Nr. 8 (vor der Dialyse) mit Acetonitril als Laufmittel.

Da die Chromatogramme bei der Verwendung von Methanol als Laufmittel vielversprechendere Ergebnisse lieferten, werden weitere Versuche durchgeführt. Jedoch kommt es dabei zu einer Überlagerung der Cysteinylglycin- und Cystin-Peaks. Diese ist im nachfolgenden Chromatogramm verdeutlicht: Im Standardmix (blau) koeluiieren Cysteinylglycin und Cystin. Sie werden chromatographisch nicht getrennt und können daher nicht quantifiziert werden. Aufgrund der sehr raschen Änderung der Säuleneigenschaften ist eine stabile Trennung über längeren Zeitraum bzw. viele Analysen nicht möglich. Daher kann eine verlässliche Analyse nicht gewährleistet werden. Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Diplomarbeit die Methodik nicht ausreichend etabliert war, musste auf die weitere Auswertung der Ergebnisse verzichtet werden.

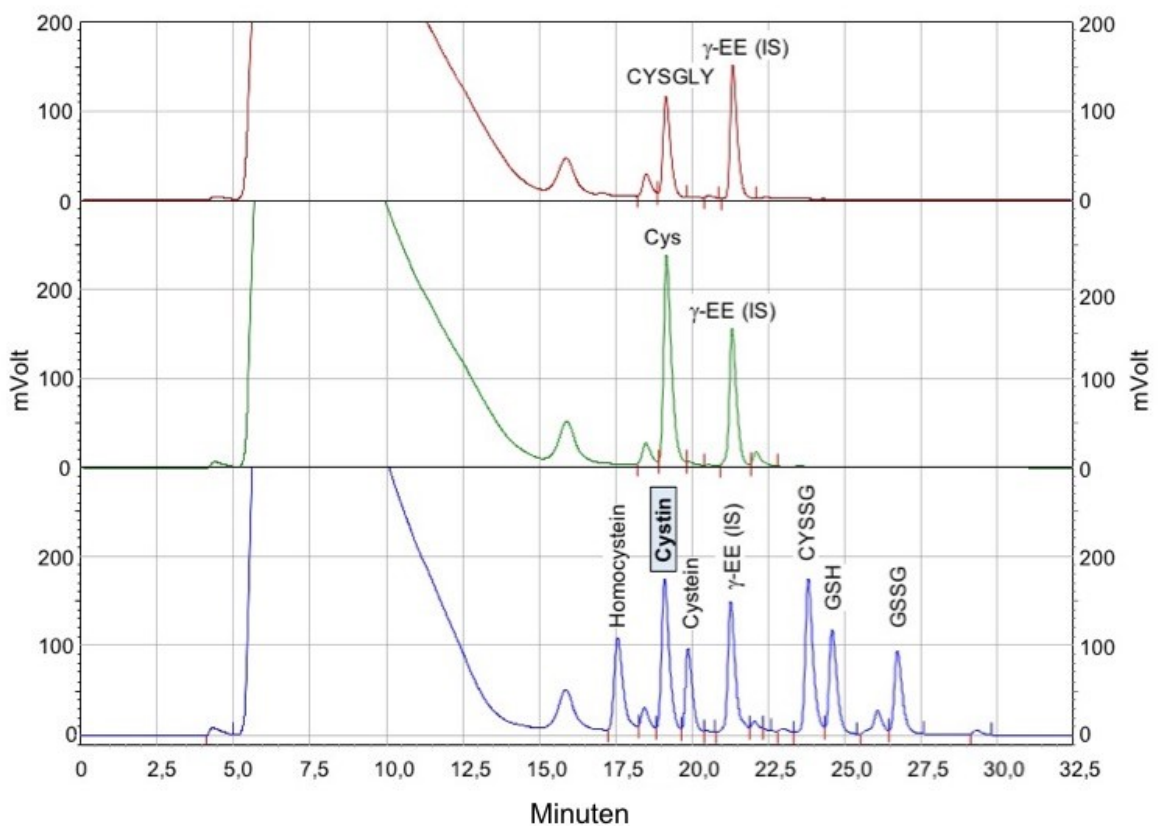


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramme der Einzelstandards von Cysteinylglycin (rot) und Cystin (grün), sowie des Standardmix (blau) mit Methanol als Laufmittel. Im Standardmix ist der Cysteinylglycin-Peak nicht mehr vom Cystin-Peak zu unterscheiden.

3.4 Ergebnisse des Zusammenhangs zwischen den Albuminfraktionen und den Plasmathiolen

Die mangelhafte Trennung der Plasmathiole ermöglichte aufgrund der beschriebenen Koelutionen und sich rasch ändernder Trennleistung der analytischen Säule keine verlässlichen Ergebnisse. Daher konnte der Zusammenhang zwischen dem Redoxzustand des Albumins und den Plasma-Thiolen nicht untersucht werden.

4 Diskussion

Ziel der hier vorgestellten Pilotstudie war es, mögliche Zusammenhänge zwischen den Plasma-Thiolen und dem Redoxzustand von Albumin während einer Dialyse zu erforschen. An der Studie nahmen 20 Patientinnen und Patienten mit CKD unter Dialysetherapie teil. Die Vorher-/Nachher- Messung der Redoxzustände von Albumin zeigte für die untersuchte Gruppe eine signifikante Änderung in Richtung des humanen Mercaptalbumins.

Signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Verfahren Hämodialyse und Hämodiafiltration waren dabei nicht zu beobachten. Weiters konnten durch Korrelationsanalysen keine Zusammenhänge zwischen den Ausgangswerten des Albumins sowie den Variablen Alter und Geschlecht festgestellt werden. Ebenso waren keine Zusammenhänge zwischen Verschiebungen der Albuminfraktionen und Alter, Geschlecht sowie den Leberwerten GGT, AST und ALT beobachtbar.

Die quantitative und qualitative Messung der Thiole konnte trotz mehrmaliger Adaptierung mit der verwendeten Methode nicht hinreichend erfolgen. Daher konnte aufgrund der fehlenden Daten die Änderungen bei den Plasma-Thiolen in dieser Pilotstudie nicht beurteilt werden. Die geplante Untersuchung des möglichen Zusammenhanges mit dem Redox-Zustand von Albumin konnte daher ebenso nicht durchgeführt werden.

Im Vergleich mit gesunden Menschen (51,64) zeigten sich bei den Patientinnen und Patienten dieser Studie niedrigere Anteile von HMA sowie erhöhte Anteile von HNA-1 und HNA-2. Es konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Dialyse einen positiven Effekt im Sinne einer Verschiebung in Richtung des nicht oxidierten Humanen Mercaptalbumins auf den Redox-Zustand von Albumin hat. Die Ergebnisse der Albuminmessungen in Abhängigkeit einer Dialysebehandlung in Richtung des HMAs bestätigen eine Studie von Soejima *et al.* (43).

Soejima et al. beschreiben in ihrer Studie vor der Dialyse Werte von 59.6 ± 8.9 bei HMA, 38.2 ± 8.7 bei HNA-1 und 2.2 ± 0.5 bei HNA-2. Nach der Dialyse werden Werte von 76.0 ± 8.4 (HMA) 21.7 ± 8.0 (HNA-1). Somit sind die Werte für HMA und HNA-1 bei Soejima *et al.* vergleichbar mit den Werten der Stichprobe dieser Studie. Die HNA-2-Werte fallen jedoch bei Soejima *et al.* deutlich niedriger aus (beispielsweise HNA-2 vor der Dialyse: 2.2 ± 0.5 versus 9.5 ± 2.5).

Während Soejima *et al.* die Albumin-Redoxzustände bei ihren dreizehn Patientinnen und Patienten nur unter HD-Behandlung untersuchten, wurden im Vergleich dazu in der hier vorliegenden Studie elf Patientinnen und Patienten mit HD und neun mit HDF behandelt. Da allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Redoxzuständen in Abhängigkeit von den zwei unterschiedlichen Behandlungsverfahren für unsere Studienpopulation festgestellt werden konnte, spricht das für eine Vergleichbarkeit der beiden Studiendesigns.

Bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme ist zu erwähnen, dass die Messung von HNA-2 aufgrund seiner geringen Menge und dementsprechende geringe Peak-Bildung nur erschwert möglich ist. Zusätzlich wird die quantitative Auswertung durch die unvollständige Trennung des HNA-2-Peaks vom HNA-1-Peak erschwert.

Die Messergebnisse für den Redoxzustand von Albumin könnten durch weitere Faktoren beeinflusst worden sein. Medikamente wie etwa Acetylcystein (65) oder eine Substitution von Eisen (66) können einen Einfluss auf oxidativen Stress haben. Es gibt auch Evidenz dafür, dass Raucher einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind (32,39). Die Medikation sowie das Rauchverhalten wurden bei den an dieser Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten nicht erhoben. Somit könnten sie bei zukünftigen Studien zum Redox-Zustand von Albumin einen zusätzlichen Fokus darstellen.

Der Redox-Zustand von Albumin könnte durch die verwendete Dialysemembran beeinflusst worden sein. Es gibt Evidenz dafür, dass mit Vitamin-E beschichtete Membranen zu geringerem oxidativem Stress und einer geringeren Konzentration des oxidierten Low Density Lipoproteins (oxLDL) führen (67,68). Ebenso konnte gezeigt werden, dass diese Membranen eine signifikante Verminderung von oxidativen DNA-Schäden nach sich ziehen (69). Die in dieser Studie verwendete Membran war nicht mit Vitamin-E beschichtet, daher

ist keine Beeinflussung der Studienergebnisse zu erwarten. Der Effekt einer solchen Membran auf den Redox-Zustand von Albumin wurde bis dato noch nicht untersucht und könnte daher einen Fokus zukünftiger Forschung darstellen.

Im Vergleich zu Patientinnen und Patienten mit Leberzirrhose bzw. mit akut-auf-chronischem Leberversagen (ACLF) (64) sowie Diabetes mellitus (70) zeigten sich bei den Patientinnen und Patienten der hier vorliegenden Studie ebenso erhöhte Anteile der oxidierten Formen von Albumin bzw. niedrigere Anteile der nicht oxidierten Form. Stark erhöhte Anteile von HNA-2 wie bei ACLF (64) konnten bei den Patientinnen und Patienten der aktuellen Studie mit Nierenversagen nicht gemessen werden.

Während andere Studien die Gesamt-Thiole im Plasma untersuchen (56), sollten im Unterschied dazu bei der hier vorliegenden Studie die einzelnen Plasma-Thiole und Disulfide gemessen werden. Dazu wurde auf die von Jones und Liang beschriebene Methode (59) zurückgegriffen und diese adaptiert. Die Adaptierung bestand in der Verwendung von Acetonitril anstelle von Methanol als Laufmittel. Dies ermöglicht einen geringeren Druck in der Trennsäule, da Methanol in Lösungen mit Wasser einen höheren Druck benötigt (71). Jedoch zeigte sich im Rahmen der Messungen unter Acetonitril eine Änderung der Reihenfolge sowie eine Verschiebung der Peaks in Richtung der Laufmittelfront. Dies zeigt sich vor allem bei Cystin und Homocystein. Erschwerend zeigten sich neue Peak- bzw. Doppelpeak-Bildungen.

Um zu überprüfen, ob sich durch eine Verwendung von Methanol als Laufmittel bessere Ergebnisse erzielen lassen, wurde die Analyse als Pilotversuch mit dem internen Standardmix und einer Patientinnenprobe durchgeführt. Methanol dürfte sich als Laufmittel besser zur Auftrennung der Thiole eignen. Jedoch zeigten sich nach zu Beginn vielversprechenden Ergebnissen auch bei der Verwendung von Methanol Schwierigkeiten im Sinne einer Überlagerung der Peaks von Cystin und Cysteinylglycin. Dadurch, dass Cysteinylglycin eines der häufigsten Thiole darstellt (72), ist eine Überlagerung dieser Peaks nicht vernachlässigbar. Bei Jones und Liang wird dieses Problem interessanterweise nicht beschrieben. Es muss jedoch erwähnt werden, dass in ihrer Arbeit das Cysteinylglycin nicht gemessen wurde.

Die unzureichende Trennleistung machte die qualitative und quantitative Auswertung unmöglich. Nach zahlreichen Versuchen mit variierenden Konditionen, wie etwa einer Erhöhung der Säulentemperatur auf 45°C, konnte keine hinreichende Trennleistung erzielt werden. Daher war die weitere Auswertung der Thiol-Messung nicht möglich.

Diese Studie sollte eine erste Grundlage für die Untersuchung des Zusammenhangs des Redoxzustands von Albumin und den Plasma-Thiolen darstellen. Durch die Dialysebehandlung ergab sich bei der untersuchten Patientengruppe die Gelegenheit einer Messung zu zwei Zeitpunkten. Dies ermöglichte eine Beobachtung des Einflusses einer Dialyse auf die Albuminfraktionen und die Plasmathiole. Nachdem mittels der hier verwendeten Methode die Analyse der Thiole/Disulfide nicht zufriedenstellend gegeben war, wird eine Auswertung der ursprünglich für diese Studie gewonnenen Proben mit einer adaptierten Methodik zu einem späteren Zeitpunkt angestrebt. Die Methodik zur Thiol-Auswertung soll in Vorversuchen weiter verfeinert und auf ihre Ergebnisqualität geprüft werden, um die Studiendaten bestmöglich auswerten zu können. Dies soll zukünftig eine vollständige Beantwortung der Forschungsfrage ermöglichen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische Anatomie der Niere, adaptiert (73)	9
Abbildung 2: Fluss-Schema der Hämodialyse, nach (15), der Stoffaustausch erfolgt über Diffusion (strichlierte Pfeile).....	12
Abbildung 3: Fluss-Schema der High-flux-Dialyse nach (15). Strichlierte Pfeile stellen die Diffusion dar, durchgezogene die Konvektion.....	12
Abbildung 4: Fluss-Schema der Hämofiltration, nach (15), Der Stoffaustausch erfolgt über Konvektion (durchgezogene Pfeile)	13
Abbildung 5: Fluss-Schema der Hämodiafiltration nach (15), Stoffaustausch mittels Diffusion (gestrichelte Pfeile) und Konvektion (durchgezogene Pfeile)	13
Abbildung 6: Glutathion als Antioxidans, adaptiert (26); Glutathion verfügt in reduzierter Form über die Thiolgruppe (-SH) und wird deshalb als GSH abgekürzt (34).	17
Abbildung 7: Drei-Dimensionale Struktur von Albumin mit hervorgehobenem Cys-34 (74)	19
Abbildung 8: Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen zwei Cystein-Molekülen nach (22)	20
Abbildung 9: Typische HPLC-Chromatogramme am Beispiel von Patientin Nr.18 vor (blau) und nach (rot) der Dialyse	27
Abbildung 10: Histogramme der HMA-Fraktionen vor und nach der Dialyse.....	27
Abbildung 11: Boxplot von HMA in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach der Dialyse in der gesamten Gruppe (n=20).....	28
Abbildung 12: Boxplot von HNA-1 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach der Dialyse in der untersuchten Gruppe (n=20); 1... Ausreißer außerhalb des 1,5 – fachen Interquartilabstands	29
Abbildung 13: Boxplot von HNA-2 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach der Dialyse in der untersuchten Gruppe (n=20); 5... Ausreißer außerhalb des 1,5 – fachen Interquartilabstands	30
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm des Standardmix mit Acetonitril als Laufmittel. Zusätzliche Peakbildungen sowie eine Verschiebung des Cystin-Peaks in Richtung der Laufmittelfront erschweren die weitere Auswertung	34
Abbildung 15: HPLC-Chromatogramm des Standardmix mit Methanol als Laufmittel. Es zeigt sich eine gute Peakbildung, jedoch ist die Reihenfolge der Peaks im Vergleich zum Chromatogramm mit Acetonitril verändert. Beim Peak des internen Standards (γ -EE (IS)) kommt es zu einer Koeluierung mit einer anderen Verbindung.	34

Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm eines gesunden Probanden mit Acetonitril als Laufmittel	35
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von Patientin Nr. 8 (vor der Dialyse) mit Acetonitril als Laufmittel.....	35
Abbildung 18: HPLC-Chromatogramme der Einzelstandards von Cysteinylglycin (rot) und Cystin (grün), sowie des Standardmix (blau) mit Methanol als Laufmittel. Im Standardmix ist der Cysteinylglycin-Peak nicht mehr vom Cystin-Peak zu unterscheiden.....	36

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laufmittelzusammensetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Analyse der Redoxzustände von Albumin mittels HPLC.	23
Tabelle 2: Laufmittelzusammensetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Analyse der Thiole mittels HPLC.	24
Tabelle 3: Mittelwerte von Gesamtprotein und Albumin der Gesamtgruppe der Studie sowie in Abhängigkeit des Behandlungsverfahrens:	26
Tabelle 4: Mittelwerte des Kreatinins der Patientinnen und Patienten der Studie:.....	26
Tabelle 5: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HMA in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse (n=11), Hämodiafiltration (n=9) und der Gesamtgruppe (n=20).....	28
Tabelle 6: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HNA-1 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse (n=11), Hämodiafiltration (n=9) und der Gesamtgruppe (n=20).....	29
Tabelle 7: Ergebnis der Mann-Whitney U Tests für HNA-2 in Prozent am Gesamtalbumin vor und nach Dialyse bei Hämodialyse (n=11), Hämodiafiltration (n=9) und der Gesamtgruppe (n=20).....	30
Tabelle 8: Korrelationsanalyse für die Variable Alter und die Ausgangswerte der drei Albuminfraktionen in Prozent am Gesamtalbumin.	31
Tabelle 9: Korrelationsanalyse für die Variable Geschlecht und die Ausgangswerte der drei Albuminfraktionen in Prozent am Gesamtalbumin.	31
Tabelle 10: Korrelationsanalyse für die Variable Verfahren und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.	32

Tabelle 11: Korrelationsanalyse für die Variable Geschlecht und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.	32
Tabelle 12: Korrelationsanalyse für die Variable Alter und die Verschiebungen der drei Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse.	32
Tabelle 13: Korrelationsanalyse für die Variablen GGT, AST und ALT und die Verschiebungen der Albuminfraktionen vor und nach der Dialyse	33
Tabelle 14: Rohdaten der Albuminmessung aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, links vor der Dialyse, rechts nach der Dialyse	48
Tabelle 15: Blutbild aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, Messzeitpunkt vor der Dialysebehandlung.....	49
Tabelle 16: Routinelaborwerte aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, Messzeitpunkt vor der Dialysebehandlung.....	50

7 Literaturverzeichnis

1. Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2006.
2. Kurtz A, Wagner C. Niere und Salz-/Wasserhaushalt. In: Duale Reihe Physiologie. Stuttgart: Thieme; 2012. p. 290–330.
3. Ziegler P. Die Nieren. In: Horn F, editor. Biochemie des Menschen. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 563–74.
4. Lang F. Niere. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. Physiologie des Menschen. 31. Auflag. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 629–63. (Springer-Lehrbuch).
5. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th editio. New York: Oxford University Press; 2007.
6. Veelken R, Ditting T. Nephrologie. In: Duale Reihe Innere Medizin. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. p. 843–1024.
7. Lüllmann-Rauch R. Harnorgane. In: Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 443–66.
8. Herold G, Kindler J. Nephrologie. In: Herold Innere Medizin. Köln: Gerd Herold; 2017. p. 598–656.
9. Lang F. Niere, Salz-Wasser-Haushalt. In: Silbernagl S, Lang F, editors. Taschenatlas Pathophysiologie. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 100–45.
10. Foley R, Parfrey P, Sarnak M. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5):112–9.
11. Levey A, Beto J, Coronado B, Eknoyan G, Foley R, Kasiske B, et al. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5):853–906.
12. Rosenkranz A, Krisper P, Eller K. Chronische Niereninsuffizienz. *Österreichische Ärztezeitung* Nr 21, 10 November 2015. 2015;22–30.
13. Keller C, Geberth S. Praxis der Nephrologie. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
14. International Society of Nephrology (ISN). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2013;3(1).
15. Girndt M. Behandlungsverfahren und ihre Differentialindikation. In: Girndt M, Kuhlmann MK, editors. Aktuelle Behandlungsstrategien in der Hämodialyse. 3. Auflage. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2014. p. 23–43.
16. Pingoud A, Urbanke C. Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisation. In: Arbeitsmethoden der Biochemie. Berlin, New York: de Gruyter; 1997. p. 57–62.
17. Liu KD, Chertow GM. Dialyse zur Behandlung des Nierenversagens. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin.* 19. Auflag. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016. p. 2239–45.
18. Geberth S, Nowack R. Peritonealdialyse. In: Praxis der Dialyse. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 183–224.
19. Geberth S, Nowack R. Hämodialyse - technische Komponenten. In: Praxis der Dialyse. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 27–72.
20. Girndt M. Dialysemembran und Dialyseflüssigkeit. In: Girndt M, editor. Aktuelle Behandlungsstrategien in der Hämodialyse. 3. Auflage. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2013. p. 56–78.
21. Schmaldienst S, Hörl W. Biokompatibilität. In: Hörl W, Wanner C, editors. Dialyseverfahren in Klinik und Praxis. 6. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme;

2003. p. 223–30.
22. Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. *Chemie in der Medizin*. 9. Auflage. Berlin: de Gruyter; 2008.
 23. Mortimer CE, Müller U. *Chemie*. 10. Auflag. Stuttgart: Thieme; 2010. 562 p.
 24. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. *PLANT Physiol*. 2006 Jun 1;141(2):312–22.
 25. Horn F. *Allgemeine Chemie*. In: Horn F, editor. *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 2–17.
 26. Berghold S. Das Blut - Die Erythrozyten. In: Horn F, editor. *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 481–92.
 27. Brandt U. Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 252–6.
 28. Lang F. Atmung, Säure-Basen-Haushalt. In: Silbernagl S, Lang F, editors. *Taschenatlas Pathophysiologie*. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 70–99.
 29. von Zglinicki T. Alter und Altern. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen*. 31. Auflag. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 877–89. (Springer-Lehrbuch).
 30. Pohl U. Der Sauerstoff im Gewebe: Substrat, Signal und Noxe. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen*. 31. Auflag. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 763–77. (Springer-Lehrbuch).
 31. Brigelius-Flohé R, Petrides PE. Essentielle Spurenelemente. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 736–44.
 32. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):7915–22.
 33. Müller-Newen G, Petrides PE. Blut – Thrombocyten und Leukocyten. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 877–92.
 34. Müller-Newen G, Petrides PE. Blut – Hämatopoese und Erythrocyten. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 863–76.
 35. Röhm K-H. Funktioneller Aminosäurestoffwechsel. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 325–51.
 36. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
 37. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar 1;82(2):291–5.
 38. Sies H, Jones D. Oxidative Stress. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress*. San Diego: Elsevier; 2007. p. 45–8.
 39. Dalle-Donne I. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem*. 2006 Feb 16;52(4):601–23.
 40. Locatelli F, Canaud B, Eckardt K-U, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Jul 1;18(7):1272–80.
 41. 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;1988–93.
 42. Rosas-Díaz M, Camarillo-Cadena M, Hernández-Arana A, Ramón-Gallegos E, Medina-Navarro R. Antioxidant capacity and structural changes of human serum

- albumin from patients in advanced stages of diabetic nephropathy and the effect of the dialysis. *Mol Cell Biochem.* 2015 Jun 11;404(1–2):193–201.
43. 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.
 44. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2571–8.
 45. Himmelfarb J, McMenamin E, McMonagle E. Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002 Feb;61(2):705–16.
 46. Müller-Newen G, Petrides P. Blut - Bestandteile und Blutplasma. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Biochemie und Pathobiochemie.* 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 857–62.
 47. Horn F. Das Blut - Das Blutplasma. In: Horn F, editor. *Biochemie des Menschen.* 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. p. 515–22.
 48. Peters T. All about albumin. San Diego: Academic Press; 1996.
 49. Meloun B, Morávek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* 1975;
 50. Oetl 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.
 51. Oetl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Methods in enzymology.* Elsevier; 2010. p. 181–95.
 52. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:244–53.
 53. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001 Jul;60(1):358–63.
 54. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Milzani A, Rossi R. Age-Related Influence on Thiol, Disulfide, and Protein-Mixed Disulfide Levels in Human Plasma. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2006 Oct 1;61(10):1030–8.
 55. Kalbitzer HR. Proteine – Struktur und Funktion. In: *Biochemie und Pathobiochemie.* 9. Auflage. Berlin, Heidelberg; 2014. p. 61–85.
 56. Gerardi G, Usberti M, Martini G, Albertini A, Sugherini L, Pompella A, et al. Plasma Total Antioxidant Capacity in Hemodialyzed Patients and Its Relationships to other Biomarkers of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation. *Clin Chem Lab Med.* 2002 Jan 1;40(2).
 57. Gambro Hospal. Polyflux™ H – High Flux Dialyse [Internet]. [cited 2017 Aug 1]. Available from: <https://pri.rn.dk/Assets/12171/Polyflux-H-Spezifikation.pdf>
 58. 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 12;31(5):435–42.
 59. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov;47(10):1329–38.
 60. Field A. *Discovering Statistics using SPSS.* 3. Edition. London: Sage; 2009.
 61. Held L, Rufibach K, Seifert B. *Medizinische Statistik: Konzepte, Methoden, Anwendungen.* 1. Edition. Hallbergmoos: Pearson Studium; 2013.
 62. Bundesministerium für Gesundheit und Frauen. Gesamteiweiß [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 10]. Available from: <https://www.gesundheit.gv.at/labor/laborwerte/organe-stoffwechsel/eiweissstoffwechsel-ernaehrung-01-tp1-hk>

63. Meduni Graz. Laborparameter [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 10]. Available from: http://www.medunigraz.at/labordiagnostik/inst_alphabet.htm
64. 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 - Mol Basis Dis.* 2008 Jul;1782(7–8):469–73.
65. Tepel M. The Antioxidant Acetylcysteine Reduces Cardiovascular Events in Patients With End-Stage Renal Failure: A Randomized, Controlled Trial. *Circulation.* 2003 Feb 25;107(7):992–5.
66. Anraku M, Kitamura K, Shinohara A, Adachi M, Suenaga A, Maruyama T, et al. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):841–8.
67. Tsuruoka S, Kawaguchi A, Nishiki K, Hayasaka T, Fukushima C, Sugimoto K, et al. Vitamin E-bonded hemodialyzer improves neutrophil function and oxidative stress in patients with end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2002 Jan;39(1):127–33.
68. Kirmizis D, Papagianni A, Belechri A-M, Memmos D. Effects of vitamin E-coated membrane dialyser on markers of oxidative stress and inflammation in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Jul 1;26(7):2296–301.
69. Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, Silva I, Díaz JM, Ballarín J, Marcos R, et al. Vitamin E-coated dialysis membranes reduce the levels of oxidative genetic damage in hemodialysis patients. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2017 Mar;815:16–21.
70. Oettl K, Reibnegger G, Schmut O. The redox state of human serum albumin in eye diseases with and without complications. *Acta Ophthalmol.* 2011 Mar;89(2):e174–9.
71. Corporation S. Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 1]. Available from: <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/letalk/35/35lab.html>
72. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal Biochem.* 1992 Feb;200(2):218–29.
73. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. *Physiologie.* Stuttgart: Thieme; 2017. 296 p.
74. Smith MEB, Caspersen MB, Robinson E, Morais M, Maruani A, Nunes JPM, et al. A platform for efficient, thiol-stable conjugation to albumin's native single accessible cysteine. *Org Biomol Chem.* 2015;13(29):7946–9.

8 Rohdaten & Dokumente

8.1 Albuminmessung

Pat ID	Vor der Dialyse							Nach der Dialyse						
	HMA	HNA-1	HNA-2	gesamt	% HMA	% HNA-1	% HNA-2	HMA	HNA-1	HNA-2	gesamt	% HMA	% HNA-1	% HNA-2
1	5168	1613	458	7239	71,39	22,28	6,33	6000	576	382	6959	86,22	8,28	5,49
2	6285	2281	595	9162	68,60	24,90	6,50	7699	1810	1117	10626	72,45	17,04	10,51
3	5120	2696	745	8561	59,81	31,49	8,70	6583	1224	390	8197	80,31	14,93	4,76
4	5173	4841	1278	11292	45,81	42,87	11,31	6601	2793	939	10333	63,88	27,03	9,08
5	3780	2660	1180	7620	49,61	34,91	15,48	4083	1984	832	6898	59,18	28,75	12,06
6	4834	2859	1348	9040	53,47	31,63	14,91	5313	1718	838	7869	67,52	21,84	10,64
7	4641	1919	576	7136	65,04	26,89	8,07	5937	1333	496	7767	76,45	17,17	6,39
8	4617	2829	809	8255	55,93	34,27	9,80	5231	1994	491	7717	67,79	25,84	6,37
9	5013	2783	691	8487	59,06	32,79	8,14	6275	1814	685	8775	71,52	20,67	7,81
10	5339	3839	1029	10207	52,31	37,61	10,08	6640	2158	512	9310	71,32	23,18	5,50
11	4434	2711	844	7988	55,50	33,94	10,56	6123	1884	937	8944	68,46	21,06	10,48
12	3957	4066	744	8767	45,14	46,38	8,48	7628	2458	704	10789	70,70	22,78	6,52
13	3932	3189	914	8035	48,94	39,69	11,37	6713	2003	434	9151	73,36	21,89	4,75
14	5865	2749	562	9175	63,92	29,96	6,12	6769	1567	598	8934	75,76	17,54	6,70
15	5349	2369	616	8334	64,18	28,43	7,39	6650	1602	648	8899	74,72	18,00	7,28
16	5313	2731	871	8915	59,60	30,64	9,77	7041	1719	284	9044	77,86	19,00	3,14
17	5891	3281	932	10105	58,30	32,47	9,23	8337	2135	598	11069	75,31	19,29	5,40
18	3746	3397	650	7793	48,07	43,59	8,34	5007	2040	460	7506	66,70	27,17	6,12
19	5746	2718	1108	9572	60,03	28,40	11,57	8377	1130	630	10137	82,64	11,15	6,22
20	5878	2745	804	9427	62,35	29,12	8,53	7725	1577	589	9892	78,10	15,94	5,96

Tabelle 14: Rohdaten der Albuminmessung aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, links vor der Dialyse, rechts nach der Dialyse

8.2 Blutbild

Pat ID	WBC ¹	RBC ²	HGB ³	HCT ⁴	MCV ⁵	MCH ⁶	MCHC ⁷	PLT ⁸
1	7	4,23	12	0,378	89,4	28,4	31,7	291
2	6,4	4,48	14	0,427	95,3	31,3	32,8	65
3	6,2	4,25	12,6	0,388	91,3	29,6	32,5	234
4	5,3	3,61	11,9	0,346	95,8	33	34,4	151
5	3,5	3,44	10,8	0,325	94,5	31,4	33,2	203
6	5,9	2,83	9,6	0,274	96,8	33,9	35	259
7	10,7	3,33	10,4	0,324	97,3	31,2	32,1	210
8	9,6	2,74	7,7	0,240	87,6	28,1	32,1	371
9	3,2	3,37	9,5	0,298	88,4	28,2	31,9	126
10	7	3,38	10,9	0,320	94,7	32,2	34,1	341
11	6,2	3,52	11,1	0,350	99,4	31,5	31,7	139
12	6,7	3,56	11,7	0,354	99,4	32,9	33,1	115
13	11,4	3,2	10,6	0,315	98,4	33,1	33,4	316
14	6,8	4,67	12,8	0,408	87,4	27,4	31,4	244
15	8,4	2,69	8,5	0,257	95,5	31,6	33,1	175
16	4,5	3,68	11,7	0,359	97,6	31,8	32,6	164
17	8	3,8	11,5	0,343	90,3	30,3	33,5	215
18	3,7	3,12	11,3	0,325	104,2	36,2	34,8	164
19	2,1	3,94	9,7	0,279	70,8	24,6	34,8	138
20	2,7	4,2	12,3	0,387	92,1	29,3	31,8	270

Einheiten: ¹⁾ x10³/μL, ²⁾ x10⁶/μL, ³⁾ g/dL, ⁴⁾ %, ⁵⁾ fL, ⁶⁾ pg, ⁷⁾ g/dL, ⁸⁾ x10³/μL

Tabelle 15: Blutbild aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, Messzeitpunkt vor der Dialysebehandlung

8.3 Routinelaborwerte

Pat ID	GGT ¹	AST ²	ALT ³	Total Protein ⁴	UA ⁵	UREA UV ⁶	Albumin ⁷	BiliT ⁸	Glu ⁹	Crea ¹⁰	LDH SCE mod ¹¹	CRP ¹²
1	65,06	37,63	38,82	6,79	7,16	73,47	4,36	0,67	75,55	5,72	392,25	>20
2	14,90	16,70	11,20	5,41	5,73	66,67	5,03	0,58	69,52	8,56	829,96	0,98
3	24,35	26,59	18,26	6,78	6,65	47,32	5,15	0,60	103,71	9,36	473,96	7,09
4	24,66	20,31	19,32	7,21	5,17	76,68	5,08	0,92	62,82	10,14	351,62	1,24
5	15,81	22,40	10,84	6,08	3,94	73,17	3,54	0,70	155,71	4,67	380,51	5,34
6	66,09	32,23	19,92	6,79	3,28	71,49	4,67	0,67	90,39	4,36	434,91	1,15
7	78,61	32,95	29,81	6,41	7,94	97,12	4,41	0,76	98,88	0,02	306,03	>20
8	49,00	21,62	21,51	6,84	7,71	62,88	4,99	0,82	134,44	10,45	345,84	13,76
9	17,48	21,24	15,32	6,56	7,43	66,38	5,10	1,13	156,09	5,70	365,41	7,50
10	61,46	52,21	47,13	7,09	7,41	79,83	5,82	1,34	121,21	9,84	401,85	7,49
11	40,72	30,81	31,15	6,00	7,09	16,13	4,90	0,30	80,79	4,25	323,68	6,63
12	60,67	51,88	32,46	6,72	8,17	75,77	5,21	1,11	113,87	13,66	546,34	1,47
13	15,91	21,26	10,62	7,02	6,94	56,78	5,27	0,89	78,35	11,87	407,57	6,31
14	50,52	30,57	14,02	6,90	6,90	60,95	4,97	0,85	73,91	9,75	322,97	9,36
15	26,05	31,15	27,18	5,95	4,73	72,00	4,36	0,60	88,43	8,48	490,67	1,47
16	18,21	12,27	117,74	6,81	6,41	50,71	5,10	0,31	114,85	6,69	311,82	1,79
17	31,94	18,41	142,50	6,44	8,58	63,04	5,37	0,37	189,83	7,85	533,07	2,69
18	13,34	20,16	9,86	6,18	7,97	73,93	4,07	0,48	111,02	7,67	424,78	14,31
19	37,43	24,26	18,80	6,85	6,23	56,47	5,71	0,69	100,16	11,23	446,33	<0,5
20	14,80	20,19	23,03	6,32	5,61	72,51	4,55	0,93	87,82	8,77	317,20	1,76

Einheiten: ¹⁾ U/l, ²⁾ U/l, ³⁾ U/l, ⁴⁾ g/dl, ⁵⁾ mg/dl, ⁶⁾ mg/dl, ⁷⁾ g/dl, ⁸⁾ mg/dl, ⁹⁾ mg/dl, ¹⁰⁾ mg/dl, ¹¹⁾ U/l, ¹²⁾ mg/l

Tabelle 16: Routinelaborwerte aller an der Studie teilnehmenden Patientinnen und Patienten, Messzeitpunkt vor der Dialysebehandlung

8.4 Dokumente

8.4.1 Informed Consent

Informationsblatt für Patient/innen für die Pilotstudie:

„Einfluss einer Hämodialyse-Behandlung auf den Redox-Zustand¹ von Albumin² im Zusammenhang mit der Konzentration der Plasma-Thiole und Disulfide³“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Wir freuen uns, dass Sie sich für die Teilnahme an dieser Studie interessieren. Für eine solche Teilnahme ist die schriftliche Einverständniserklärung jeder Patientin/jedes Patienten notwendig. Wir bitten Sie daher, dieses Informationsblatt aufmerksam durchzulesen. Es ist wichtig, dass Sie alles verstehen, was auf diesem Informationsblatt vermerkt ist. Bitte zögern Sie daher nicht, die anwesenden Studienmitarbeiter zu fragen, sollte es irgendwelche Unklarheiten geben.

Die Studie

Die Studie untersucht den Redoxzustand¹ von Albumin² in Abhängigkeit von einer Hämodialyse-Behandlung.

Patientinnen und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sind einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt. Unter oxidativem Stress versteht man eine Veränderung der chemischen Struktur (dem sogenannten Redoxzustand) von Molekülen im Körper, die etwa auch bei Sport oder Sauerstoffmangel auftritt. Beim Albumin sind von dieser Strukturänderung die Transporteigenschaften abhängig.

Bei der Dialyse werden verschiedene Stoffe aus dem Blut herausgefiltert, unter anderem sogenannte Thiole und Disulfide³. Albumin selbst wird nicht herausgefiltert.

Die Konzentration der Thiole und Disulfide im Blut können den Redoxzustand¹ des Serumalbumins verändern. Um die Thiole, Disulfide³ und das Albumin² messen zu können, wird Ihnen im Rahmen Ihrer Dialysebehandlung insgesamt 25ml (Milliliter) Blut abgenommen (jeweils 12,5ml vor und 12,5ml nach der Dialyse).

¹ **Redoxzustand:** Beschreibt eine bestimmte chemische Struktur von Molekülen

² **Albumin:** Häufigstes Eiweißmolekül im menschlichen Blut, das unter anderem für den Erhalt des Blutdrucks und den Transport von anderen Molekülen zuständig ist

³ **Thiole und Disulfide:** Gruppe von kleineren Molekülen im Blut, die bei der Dialyse entfernt werden

Diese 25ml Blut entsprechen ca. 2 Esslöffel Blut. Dadurch, dass ohnehin über Ihren Shunt Blut aus dem Körper entnommen wird, ist keine zusätzliche Punktion eines Blutgefäßes notwendig. Das Blut wird nach der Abnahme am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität laborchemisch aufbereitet und ausgewertet.

Um die höchstmögliche Qualität der Studie zu erreichen und verschiedene Störfaktoren, die etwa durch andere Krankheiten entstehen, auszuschließen, gibt es verschiedene Kriterien, die eine Teilnahme an der Studie verhindern. Diese sind:

- Eine Nierenrestfunktion von mehr als 500ml/24h
- Lebererkrankungen

Mögliche Beschwerden, Risiken und Fragen

Dadurch, dass keine zusätzliche Punktion eines Blutgefäßes notwendig ist und die Menge des abgenommenen Blutes gering ist, entstehen für Sie praktisch keine Risiken.

Bei Fragen und Unklarheiten zögern Sie bitte nicht, die Mitarbeiter der Studie zu fragen. Wir werden am Tag der Blutabnahme vor Ort sein und Ihnen jederzeit zur Verfügung stehen.

Die verantwortlichen Mitarbeiter der Studie sind:

- Univ.-Prof. Dr.med.univ. Alexander Rosenkranz (Klinische Abteilung für Nephrologie)
- Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Karl Öttl (Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz)
- Joachim Enzendorfer (Diplomand am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz)

Des Weiteren erreichen Sie uns telefonisch:

- Univ.-Prof. Dr.med.univ. Alexander Rosenkranz (Klinische Abteilung für Nephrologie): **+43 316/385-12170**
- Joachim Enzendorfer (Diplomand am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz): **+43 664/5326349**

Wenn Sie beschließen, doch nicht an der Studie teilnehmen zu wollen, teilen Sie uns diese Entscheidung bitte unverzüglich mit. Alle Proben und Daten, die bis zu diesem Zeitpunkt von Ihnen erhoben wurden, werden dann vernichtet und nicht ausgewertet.

Einverständniserklärung für Patientinnen und Patienten für die Pilotstudie:

„Einfluss einer Hämodialyse-Behandlung auf den Redox-Zustand von Albumin im Zusammenhang mit der Konzentration der Plasma-Thiole und Disulfide“

Ich habe ein Informationsblatt für Patientinnen und Patienten zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden.

Möglicherweise aufgetretene Fragen meinerseits wurden von den zuständigen Studienmitarbeitern ausreichend und verständlich beantwortet. Mit meiner Unterschrift auf dieser Einverständniserklärung stimme ich der einmaligen Entnahme von insgesamt 25ml (Milliliter) (jeweils 12,5ml vor und 12,5ml nach der Hämodialyse-Behandlung) und somit der Teilnahme an der Studie zu.

Ich kann diese Einverständniserklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen zurückziehen. Alle bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten Daten und Blutproben werden in diesem Fall vernichtet.

(Name der Patientin/des Patienten)

(Datum und Unterschrift der Patientin/des Patienten)

(Univ.-Prof. Dr.med.univ. Alexander Rosenkranz, Datum)

8.4.2 Ethikvotum positiv

Ethikkommission



Medizinische Universität Graz

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

VOTUM gültig bis 07.04.2017

EK-Nummer: 28-319 ex 15/16
Studientitel: Pilot study: Influence of hemodialysis on the redox state of albumin in connection with the concentration of plasma-thiols and disulfides
Prüfer: Univ.-Prof. Dr.med.univ. Alexander Rosenkranz
Klinische Abteilung für Nephrologie, Universitätsklinik Graz
Sponsor: Medizinische Universität Graz, Institut für Physiologische Chemie
Ansprechpartner: Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat Karl Öttl, 8010 Graz, Harrachgasse 21/II
CRO: -
Antragsteller: Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz
Ansprechpartner: Joachim Enzendorfer

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals im 'expedited Review' am 21.03.2016 behandelt. Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben:
keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 03.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 21.03.2016

✓ Cover Letter Begleitschreiben Enzendorfer 01	03.03.2016
✓ Antragsformular ECS	03.03.2016
Originalprotokoll Studienprotokoll Enzendorfer 01	03.03.2016
Informed Consent Form Informationsblatt und Einverständniserklärung Enzendorfer 01	03.03.2016
✓ Sonstiges: Antrag auf Gebührenerlass Enzendorfer 01	03.03.2016

Dokumente eingegangen am 15.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 21.03.2016

✓ Antragsformular ECS unterschrieben	09.03.2016
--------------------------------------	------------

Dokumente eingegangen am 31.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 07.04.2016

✓ Originalprotokoll 02	31.03.2016
✓ Informed Consent Form 02	31.03.2016
✓ Sonstiges: Ansuchen auf Gebührenerlass 02	31.03.2016

Die Ethikkommission geht - rechtlich unverbindlich - davon aus, dass es sich um keine klinische Prüfung nach AMG bzw. MPG handelt.

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

EK-Nummer: 28-319 ex 15/16

Votum (07.04.2016)

Seite 1 von 2

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz. www.medunigraz.at

Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungsblatt der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 3494.
UID: ATU 575 111 79. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen
- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)
- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

zusätzliche Auflagen: Vor Einschluss des Zentrums Dialyseinstitut Dr. Wallner Feldbach ist der Ethikkommission eine Zustimmungserklärung des Dialyseinstitutes vorzulegen.

Dieses Votum gilt für ein Jahr ab dem Datum der Ausstellung. Bei längerer Studiendauer ist rechtzeitig vor Ablauf der Gültigkeit des Votums ein Zwischenbericht vorzulegen (Berichtsformular), um eine etwaige Verlängerung zu erlangen.

Graz, 07. April 2016



Univ. Prof. DI Dr. Josef Haas
Vorsitzender



Univ. Prof. Dr. Hermann Toplak
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!