

**METABOLISCHES PROFILING MITTELS NMR-SPEKTROSKOPIE ZUR  
VORHERSAGE EINER ZUKÜNFTIGEN PROTEINURIE BEI DIABETIKERN MIT  
CHRONISCHER NIERENERKRANKUNG**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER  
**ZAHNMEDIZIN**  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND  
VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

**Iris Lang**

aus

**Nürnberg**

im Jahr

**2022**

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.06.2022

---

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Wolfram Gronwald

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
a. Physiologie der Niere .....	6
b. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	7
c. Chronische Nierenerkrankung.....	8
d. Diabetische Nephropathie .....	10
i. Epidemiologie der diabetischen Nephropathie.....	10
ii. Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie.....	11
iii. Klinik und Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie.....	12
iv. Proteinurie als Indikator der diabetischen Nephropathie.....	13
v. Behandlungsmöglichkeiten der diabetischen Nephropathie .....	14
e. NMR-Spektroskopie .....	16
i. Technik und Aufbau der NMR-Spektroskopie.....	16
ii. Physikalischer Hintergrund der NMR-Spektroskopie .....	18
iii. Relevanz in der medizinischen Analytik.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
a. Patientenselektion .....	21
i. GCKD-Studie .....	21
ii. Auswahlkriterien der Studiengruppen .....	22
iii. Erfasste Patientendaten.....	24
b. Probenmaterial und Aufbereitung.....	24
c. Auswahl der Metaboliten in Blutplasma .....	25

d.	Analyseverfahren .....	26
i.	NMR-Spektroskopie .....	26
ii.	Softwarebasierte Auswertung der NMR-Spektren .....	27
1.	Auswahl der Softwareverfahren .....	27
2.	Quantitative Auswertung mit Chenomx - Plasmaproben.....	27
3.	Bucketing mit AMIX - Urinproben .....	31
e.	Datenerfassung und statistische Auswertung .....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
a.	Patientenselektion .....	33
b.	Ergebnisse der NMR-Spektroskopie Blutplasma .....	34
i.	Plasmanalyse mit CHENOMX.....	34
ii.	Korrektur für multiples Testen .....	35
c.	Ergebnisse der NMR-Spektroskopie Urinanalyse mit AMIX .....	36
i.	Bucketing .....	36
ii.	Korrektur für multiples Testen .....	37
iii.	Metabolitenidentifizierung mit Chenomx .....	38
iv.	Hauptkomponentenanalyse mit AMIX .....	39
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
a.	Zeitfenster für Entstehung der Proteinurie .....	41
b.	Besteht Bedarf für weitere diagnostische Marker?.....	42
c.	Ausblick auf weitere Marker in der Literatur .....	43
i.	Biomarker im Blutplasma .....	44
ii.	Biomarker im Urin .....	46

d.	Der klinische Nutzen einer Früherkennung .....	47
e.	Signifikante Metaboliten .....	48
i.	identifizierte Marker im Blutserum.....	49
4.	Kreatinin( $C_4H_7N_3O$ ) .....	49
5.	Phenylalanin ( $C_9H_{11}NO_2$ ).....	51
ii.	Identifizierte Marker im Urin .....	54
6.	N-Methylhydantoin ( $C_4H_6N_2O_2$ ) .....	54
7.	Dimethylamin DMA ( $C_2H_7N$ ).....	56
f.	Limitationen .....	57
g.	NMR-Spektroskopie als klinisches Untersuchungsverfahren.....	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>62</b>
a.	Tabellenverzeichnis.....	62
b.	Abbildungsverzeichnis.....	63
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>65</b>

# 1. Einleitung

## a. Physiologie der Niere

Die paarig angelegten Nieren sind zentraler Bestandteil des Harnwegssystems. Sie erfüllen wichtige Funktionen im menschlichen Organismus:

1. Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen (Bildung von Primär- und Endharn) und Giftstoffen aus dem Körper
2. Regulation des Säure-Basen-Haushalts über Puffersysteme
3. Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts
4. Wichtiger Einfluss auf Blutvolumen und -druck
5. Stoffwechselprozesse (Gluconeogenese)
6. Hormonbildung, z.B. von Erythropoetin für die Blutbildung oder Renin zur systemischen Blutdruckregulation

Physiologische Mechanismen umfassen das Abfiltrieren von Blutbestandteilen unter einer gewissen molekularen Größe (bis zu 5000 Dalton), die Rückresorption und das aktive Sezernieren mancher Substanzen, sowie die Konzentration des wässrigen Urins.(1)

Diese Funktionen werden durch einen komplexen anatomischen Aufbau (Abbildung 1) gewährleistet. Das Kernstück sind ca. 1 Millionen Nephrone, die jeweils aus dem Nierenkörperchen mit glomerulärer Filtrationsbarriere und dem Tubulussystem bestehen. Das arterielle Gefäßstrombett der Glomeruli wird täglich von ca. 1800 Litern Blut durchströmt, dabei ca. 180 Liter Primärharn abfiltriert. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die in ml/min angegeben wird, bezeichnet das pro Zeiteinheit von den Glomeruli filtrierte Volumen. Das darauffolgende Tubulussystem produziert durch Sekretion, Rückresorption und Konzentration ca. 2 Liter konzentrierten Endharn.(1)

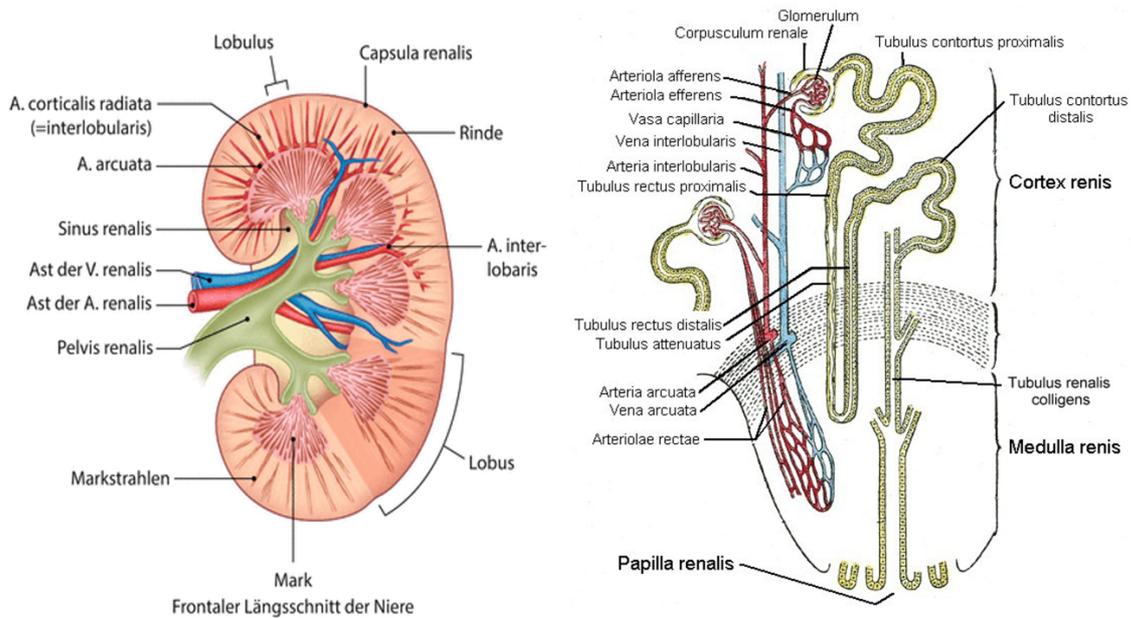


Abbildung 1: Schema des makroskopischen (links) und mikroskopischen (rechts) Aufbaus der Niere; Quelle: Linkes Bild: Die Urologie (2016) Maurice Stephan Michel Springer Verlag ISBN: 2978-3642399398; Rechtes Bild: Gray's Anatomy (1918) Anatomy of the Human Body, Tafel 1128

## b. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit Patienten mit Diabetes mellitus und einer gleichzeitig chronischen Nephropathie. Ziele waren:

1. Blutplasmaproben und Urinproben von Patienten zu akquirieren und vergleichen, die ohne Proteinurie im Verlauf von vier Jahren entweder unverändert keine Proteinurie aufweisen, oder eine solche entwickelt hatten.
2. Die Blutplasmaproben zum Ausgangszeitpunkt ohne Proteinurie mit dem Verfahren der NMR-Spektroskopie auf 25 Metaboliten quantitativ zu untersuchen.
3. Die Menge der Metaboliten in den Blutplasmaproben zwischen beiden Patientengruppen statistisch zu vergleichen und damit als Pilotstudie einen möglichen Vorhersageparameter für die Entwicklung einer Proteinurie im Verlauf einer diabetischen Nephropathie zu identifizieren.

4. Die NMR-Spektren der Urinproben zum Ausgangszeitpunkt ohne Proteinurie für beide Patientengruppen zu analysieren und statistische Abweichungen der Spektren zu identifizieren, sowie den abweichenden Spektralbereichen Metaboliten zuzuordnen, die sich als neue potentielle Marker zukünftig eignen können.

Für die Messung bzw. die Datenerhebung wurde das Verfahren der NMR-Spektroskopie und für die anschließende Auswertung der Spektren zwei unterschiedliche Quantifizierungssoftwares gewählt.

### **c. Chronische Nierenerkrankung**

Eine chronische Nierenerkrankung (englisch chronic kidney disease, CKD) liegt dann vor, wenn ein Nierenschaden unabhängig von der Grunderkrankung mehr als drei Monate besteht. Sie ist definiert durch pathologische Veränderungen der Niere in bildgebenden Verfahren (Sonographie, Magnetresonanztomographie) und/oder messbare Marker für Nierenschäden in Blut (z. B. erhöhter Harnstoff), Urin (z.B. Albuminurie), oder eine glomeruläre Filtrationsrate unter  $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ .(2)

Ein gebräuchlicher Messwert im Urin ist beispielsweise die Proteinausscheidung, die auch in unserer Arbeit eine wesentliche Rolle spielt. Der Grenzwert für eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin liegt bei unter  $30\text{ mg}/\text{g}$  ACR (Albumin-Kreatinin-Quotient, englisch albumine creatinine ratio). Hierbei wird die Albuminkonzentration auf die Kreatininkonzentration bezogen. Liegt der Wert bei  $30\text{-}300\text{ mg}/\text{g}$  spricht man von Mikroalbuminurie, bei Werten jenseits  $300\text{ mg}/\text{g}$ , Makroalbuminurie. Eine erniedrigte GFR und ein erhöhter Albuminurie-Wert führen unabhängig voneinander zu einer erhöhten Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse und terminale Nierenerkrankung.(3)

Die Stadieneinteilung (Abbildung 2) erfolgt anhand der GFR und Albuminurie gemäß der Leitlinie von KDIGO (Kidney disease: improving global outcomes) 2012, einem internationalen Verband in der Nephrologie. Gleichzeitig gibt Abbildung 2 mit der Farbkodierung Grün, Gelb, Orange und Rot in absteigender Reihenfolge für eine gute Prognose Richtlinien für Behandlungspläne.(3)

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Abbildung 2: Stadieneinteilung (mit GFR und Proteinurie Werten) und Prognose der chronischen Nierenerkrankung; Grün: geringes Risiko (wenn keine anderen Marker einer Nierenerkrankung vorliegen, keine CKD), Gelb: mäßig erhöhtes Risiko, Orange: hohes Risiko, Rot: sehr hohes Risiko; Quelle: Klinische Praxisleitlinie für Bewertung und Behandlung von CKD nach KDIGO von 2012

Zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung gehört Diabetes mellitus und Bluthochdruck. Zu den weiteren Risikofaktoren gehören Autoimmunerkrankungen, Systemische Infektionen, Harnwegsinfektionen, Harnsteine, Obstruktion der unteren Harnwege, Neoplasie, genetische Prädisposition, Exposition gegenüber Schadstoffen/Drogen/Medikamenten mit nephrotoxischen Eigenschaften, niedriges Geburtsgewicht. Auch soziodemografische Faktoren, wie Alter, Bildung und Einkommen spielen eine nicht weniger wichtige Rolle.(3)

Abbildung 3 zeigt den prozentualen Anteil der Ursachen für chronische Nierenerkrankung. Den größten Anteil beansprucht Diabetes für sich, weshalb im Folgenden näher auf die Diabetische Nephropathie eingegangen wird.

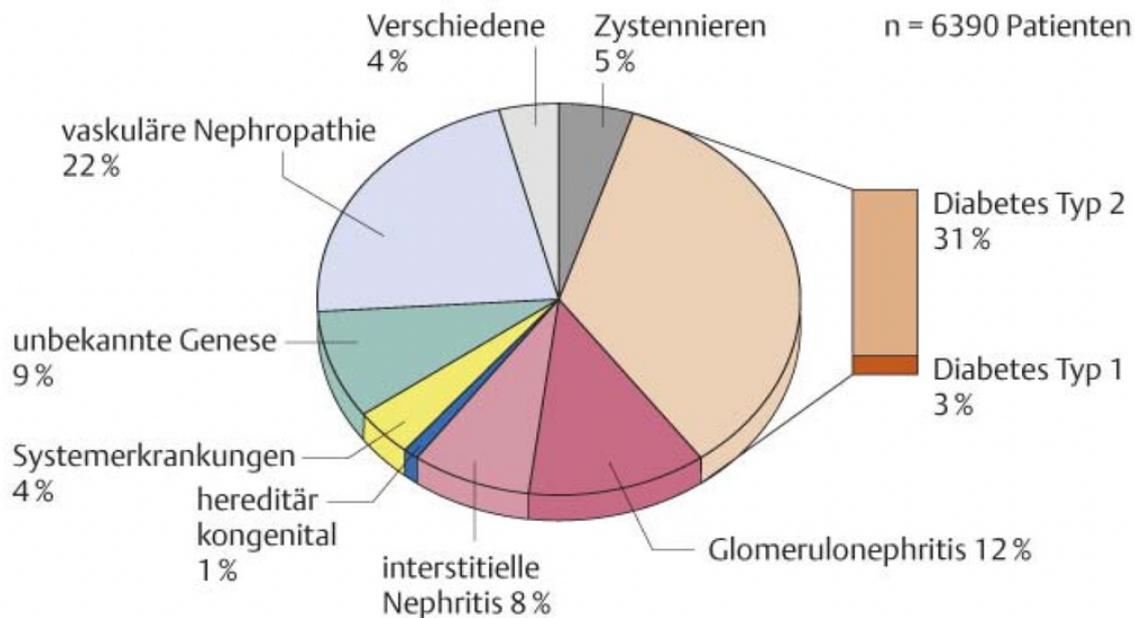


Abbildung 3: Diagnoseverteilung. Diagnosen der Patienten bei Therapiebeginn (Bericht Quasi-Niere, 2004 Deutschland); Quelle: Aus Khulmann, U., D. Walb, J.Böhler; Nephrologie (ISBN: 9783137002055) © 2008 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

## d. Diabetische Nephropathie

Als diabetische Nephropathie (DN), synonym diabetische Glomerulosklerose oder interkapilläre Glomerulonephritis, bezeichnet man eine chronische Nierenschädigung mit Funktionseinbußen, die als Komplikation des Diabetes mellitus auftritt. Die Voraussetzung für das Entstehen einer Nierenerkrankung bei Diabetikern ist eine langfristig schlechte Blutzucker- und Blutdruckeinstellung, sowie eine genetische Prädisposition.(4)

### i. Epidemiologie der diabetischen Nephropathie

Die filigrane mikrovaskuläre Struktur der Glomeruli bedingt die hohe Leistungsfähigkeit der Niere, gleichzeitig aber auch eine hohe Anfälligkeit gegenüber vaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen. Unter den etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren Nikotinabusus, arterielle Hypertension, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus kommt letzterem eine wichtige Rolle zu. Laut dem Bundesgesundheitsministerium sind in Deutschland ca. 7,2% der Erwachsenen (Alter: 18 -79 Jahre) Diabetiker, davon ca. 90-95% Typ 2. Die Stoffwechselerkrankung gilt in den industrialisierten Ländern als die häufigste Ursache einer Niereninsuffizienz.(5)

Ungefähr ein Drittel aller Typ 1 und Typ 2 Diabetiker erkranken an diabetischer Nephropathie.(6) Beide Typen haben ein gleich hohes Risiko für die Erkrankung, jedoch steht Typ 2 aufgrund der größeren Häufigkeit zahlenmäßig im Vordergrund.(7) Es besteht erheblicher Bedarf für prognostische Laborverfahren, um gefährdete Patienten einer intensivierten Prophylaxe, Surveillance und Frühtherapie zuzuführen, sobald eine Albuminurie absehbar ist – ein wesentlicher Motivationsfaktor unserer Studie.

## ii. Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie

Die Pathophysiologie der Nierenschädigung durch chronisch erhöhte Blutzuckerwerte war Gegenstand zahlreicher Studien. Letztlich ist von vielfältigen schädlichen Mechanismen auszugehen, wobei die frühe Phase von Hyperfiltration und Albuminurie und die späte Phase durch progressive Abnahme der Nierenfunktion gekennzeichnet ist(8):

1. Erweiterte Nierengefäße und Hyalinablagerungen (Hyalinose der afferenten und efferenten Arteriole) bedingen eine Druckerhöhung innerhalb des Glomerulums, dadurch eine Hyperfiltration, und konsekutive Vernarbung des Nierenkörperchens (Nephrosklerose).
2. Der erhöhte Blutzuckerspiegel führt zu vermehrter Ablagerung von Zwischenzellsubstanz (Matrix) im Glomerulus, sowie Bindung von Glucose an die Matrixproteine.(9)
3. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) und VEGF (vascular endothelial growth factor bzw. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)(10) aber auch inflammatorische Zytokine, insbesondere Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-18 und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) sind an Entstehung und Progression der diabetischen Nephropathie beteiligt.(11)
4. Das Struktureiweiß Nephrin bildet einen besonders selektiven Bestandteil der Blut-Harn-Schranke und ist bei diabetischer Nephropathie vermindert.
5. Eine erhöhte Expression des Glukosetransporters GLUT-1 in den Mesangiumzellen des Nierenkörperchens. Es resultiert eine erhöhte Glukoseaufnahme und überschießende Aktivierung glukoseabhängiger Stoffwechselwege. Letztendlich erhöht sich die Bildung von TGF- $\beta$ , welches die überschießende Produktion extrazellulärer Matrix fördert.(12)

6. Eine Hemmung der Expression von Thrombomodulin in den Endothelzellen der Glomeruli. Es folgt eine Kaskade von reduzierter Aktivierung von Protein C und damit weniger Schutz der Endothelzellen und Podozyten des Glomerulus vor Apoptose.(13)

Folge dieser schädlichen Vorgänge ist eine progressive Nierenerkrankung aufgrund einer Angiopathie der Kapillaren des Glomerulus. Das charakteristische Merkmal der diabetischen Nephropathie ist die noduläre Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson), wobei sie nicht in jedem Fall vorhanden ist. Zusätzlich zur Sklerosierung kommt es weiterhin zu einer Verbreiterung/Dilatation des Mesangiums und einer Verdickung der glomerulären Basalmembran.(9)

Es resultiert eine Druckerhöhung in den Glomeruluskapillaren und eine durch Hyperglykämie bedingte Schädigung der Podozyten. Beide Umstände bedingen den Durchtritt von Albumin, sowie höhermolekulare Serumproteine in das Filtrat.(7) Die daraus folgende Glomerulonephritis führt zu einer erhöhten Permeabilität des glomerulären Filters, die eine Passage von größeren Molekülen zusätzlich begünstigt. Weiterhin werden neben der Albuminurie noch Hypoalbuminämie und Hyperlipidämie zur Symptomatik dazugezählt(14),(15)

Ergänzend verursacht/begünstigt die Hyperinsulinämie bei Typ 2 Diabetikern eine glomeruläre Hypertonie und Hyperfiltration durch Erhöhung des glomerulären hydrostatischen Drucks und der renalen Gefäßpermeabilität.(16)

### **iii. Klinik und Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie**

Die Klinik der diabetischen Nephropathie reicht vom asymptomatischen Frühstadium über eine zunehmende Proteinurie bis zum nephrotischen Syndrom und dem Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz und Symptomen der Urämie. Die ältere Stadieneinteilung nach Mogensen 1993 wurde im Verlauf anhand der GFR nach KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) 2002 konkretisiert.(17), (18) In Tabelle 1 sind die beiden Stadieneinteilungen und typische klinische Symptome vergleichend gegenübergestellt.

Stadium	Einteilung nach Mogensen	Einteilung nach KDOQI (GFR ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Klinische Symptome
1	Hyperfiltration	≥ 90	Asymptomatisch
2	Normoalbuminurie	60–89	Evtl. Blutdruckanstieg
3	Mikroalbuminurie	30–59	Ödeme, Blutdruckanstieg, Thromboseneigung, Hyperlipidämie, Harnwegsinfekte
4	Makroalbuminurie	15–29	
5	Nierenversagen	< 15	Leistungsverlust, Inappetenz, Übelkeit/Emesis, Pruritus, Herz-Kreislaufkomplikationen

Tabelle 1: Klinik und Stadieneinteilung nach Mogensen und KDOQI

#### iv. Proteinurie als Indikator der diabetischen Nephropathie

Albumine im Blutkreislauf, bzw. Serumalbumin (Molekulargewicht: 66000 Dalton) macht mit einem Anteil von 55% ungefähr die Hälfte aller Plasmaproteine aus und wird als Markerprotein bezeichnet, da es bei glomerulären Störungen als erstes nachweisbar ist. Gesunde Nieren scheiden ca. 20 mg Albumin innerhalb von 24 Stunden aus (Normalalbuminurie). Das früheste Anzeichen einer diabetischen Nephropathie ist der Nachweis einer erhöhten Ausscheidung von Albumin im Urin.(16) Die Proteinausscheidung entsteht durch einen strukturellen renalen Schaden, was zu einer defizitären glomerulären Filtration führt.(4),(15)

Dabei bezeichnet man eine Ausscheidung von 30 bis 300 mg Albumin pro Tag als Mikroalbuminurie, die Ausscheidung von über 300 mg Albumin pro Tag als Makroalbuminurie oder Proteinurie.

Patienten mit Mikroalbuminurie haben üblicherweise eine stabile Nierenfunktion, haben jedoch ein erhöhtes Risiko eine Makroalbuminurie und Niereninsuffizienz zu entwickeln. Patienten mit Makroalbuminurie weisen in der Regel eine progressive Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR), besonders in Verbindung mit einer Zunahme des systemischen Blutdrucks auf.(5)

Eine Mikroalbuminurie ist mit herkömmlichen Urinteststreifen nicht erfassbar. Der analytische Standard ist die Bestimmung des Albumins im 24h-Sammelurin. Für eine abschätzende Routinediagnostik kann auf das Sammeln von Urin verzichtet werden. Man bestimmt simultan Albumin und Kreatinin im Urin und berechnet den Albumin-Kreatinin-Quotienten: Mikroalbuminurie ist definiert durch einen Albumin/Kreatinin-Quotienten von 30 bis 300 mg/g, Makroalbuminurie durch einen Albumin/Kreatinin-Quotienten >300 mg/g. Verfügbar sind auch spezielle Teststreifen zum Nachweis geringer Albuminkonzentrationen im Urin (sogenannter Mikraltest).(14)

Wir haben für unsere Studie die Proteinurie mittels Urin-Albumin-Kreatinin-Quotienten (UACR) aus Spot Urin/Spontanharn bestimmt. Hierbei wird die Albuminkonzentration auf die Kreatininkonzentration im Urin (Einheit: mg/g Kera) und nicht auf das Urinvolumen bezogen, damit die Ergebnisse nicht vom Verdünnungszustand/ Hydratationszustand des Urins abhängen.

#### **v. Behandlungsmöglichkeiten der diabetischen Nephropathie**

Die Basisbetreuung beinhaltet die Kontrolle und Beeinflussung von Risikofaktoren in Kombination mit Pharmakotherapie für bestimmte Patienten, sowie Lebensstilinterventionen.

Zu den allgemeinen Behandlungsstrategien gehört die Reduktion der Proteinzufuhr mit der Empfehlung von 0,8 g Eiweiß pro kg Körpergewicht pro Tag. Für eine Risikosenkung der Nephropathieprogression und Gefäßschädigung soll dem Patienten vom Tabakkonsum abgeraten werden. Weiterhin gehören zu den nephroprotektiven Maßnahmen die Vermeidung von Röntgenkontrastmitteln, nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Langzeiteinnahme von Mischanalgetika. Harnwegsinfektionen sollten antibiotisch therapiert werden und grundsätzlich gilt es

jegliche verabreichten Medikamente an eine reduzierte Nierenfunktion anzupassen.(19)

Die spezifischen therapeutischen Maßnahmen richten sich je nach Schweregrad bzw. Stadium der Erkrankung, sowie Komorbiditäten. Patienten mit Diabetes und diabetischer Nephropathie und anderen möglichen Folgeerkrankungen sollten interdisziplinär behandelt werden, um das Risiko des Fortschreitens der Nierenerkrankung sowie von Herz-Kreislauf- Erkrankungen zu reduzieren.(20)

An oberster Stelle steht die Blutzuckerkontrolle und Einstellung des HbA1c-Wertes <7,0% (< 53mmol/mol). Die Dosierung der Antidiabetika ist an die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate anzupassen. Nicht weniger wichtig ist die Blutdruckregulierung mit antihypertensiven Medikamenten. Dabei sollen der diastolische Wert 80 mmHg und systolische Wert unter 140 mmHg angestrebt werden, was in der Regel mit zwei bis drei Antihypertensiva aus verschiedenen Wirkstoffgruppen gut zu erreichen ist. Für eine Zweifachkombination werden als Kombinationspartner für die primär eingesetzten ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonisten neben Kalziumantagonisten zusätzlich Diuretika empfohlen. Bei einem Serumkreatinin-Wert von 1,8 mg/dl werden Thiazidanaloga oder Thiazide verabreicht und bei stärker eingeschränkter Nierenfunktion Schleifendiuretika. Bei der Dreifachkombination werden zusätzlich Betablocker oder Verapamil verabreicht. Der LDL-Cholesterin-Wert sollte unter 100 mg/dl (< 2,6 mmol/L) bleiben, dazu sind Kontrollen des Lipoproteinstatus alle drei bis sechs Monate indiziert. Für die medikamentöse Behandlung eines erhöhten Spiegels sind Statine das Mittel der ersten Wahl.(19),(21)

Im Wesentlichen umfasst das Ziel der konservativen Therapie die Verlangsamung der Progression und die Senkung des Risikos von Herz-Kreislauf-Komplikationen (z. B. Myokardinfarkt oder Schlaganfall) oder anderen Folgeerkrankungen.

## **e. NMR-Spektroskopie**

### **i. Technik und Aufbau der NMR-Spektroskopie**

Nukleare magnetische Resonanz-spektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy) auch Kernspinresonanzspektroskopie genannt, ist neben der IR-Spektroskopie (Infrarot-Spektroskopie), der Massen-Spektroskopie (MS) und der Elementaranalytik eine der wichtigsten analytischen Methoden der organischen Chemie.(22) Die Spektroskopie umfasst eine Reihe physikalischer Untersuchungsmethoden, die Aussagen über qualitative und quantitative Zusammensetzung einzelner chemischer Komponenten einer gemessenen gemischten Substanz macht. Bei der NMR-Spektroskopie im Speziellen wird die elektronische/magnetische Umgebung einzelner Atome/Atomkerne, sowie deren Wechselwirkung untersucht und zur Identifizierung, Quantifizierung und Strukturbestimmung von Molekülen genutzt.(23) In der NMR werden damit für die einzelnen NMR-aktiven Atomkerne eines Moleküls Resonanzfrequenzen beobachtet, die von der jeweiligen elektronischen Umgebung des Kerns abhängig sind. Die Positionen der Signale sind damit charakteristisch für die einzelnen chemischen Gruppen eines Moleküls, während über die Integrale der Signale eine absolute Quantifizierung möglich ist. Somit eignet sie sich neben der Massen-Spektrometrie im Rahmen metabolomischer und metabonomischer Studien für die Mehrkomponentenanalyse von biologischen Flüssigkeiten und Geweben.(24)

Ein NMR-Spektrometer besteht aus einem Magneten, einem Radiofrequenzsynthesizer zur Bereitstellung der resonanten Radiofrequenzfelder, einer Spule zum Empfangen und Senden der Information über die Probe und einer Antenne und Verstärkerelektronik zum Nachweis von Resonanzsignalen.(25) Bei dem Magneten handelt es sich in der Regel um einen Kryomagneten, welcher von einem leistungsstarken, meist auf flüssigem Helium und Stickstoff basierendem Kühlsystem umgeben ist.(26) Zur weiteren Ausstattung eines Spektrometers gehören zudem noch ein Transmitter, der ein transversales, elektromagnetisches Wechselfeld für die Messung der erforderliche Frequenzen erzeugt, ein Receiver für Signalempfang und -weiterleitung, sowie ein Computer zur Datenerfassung.(26)

## Moderner NMR-Spektrometereaufbau mit supraleitendem Magneten

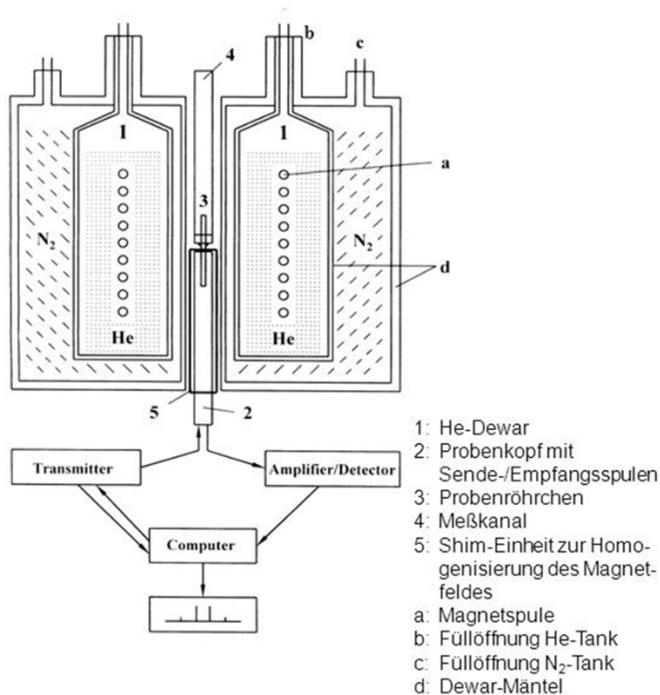


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Spektrometers. Quelle: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, 4. Auflage Horst Friebolin (2006) Wiley-VCH Verlag, Weinheim ISBN-3-527-31571-3

Mittels unterschiedlicher Computerprogramme lassen sich anschließend die gemessenen Spektren bildlich darstellen und auswerten. Die eindimensionale NMR-Spektroskopie ist im Vergleich zur zweidimensionalen die am häufigsten angewandte Strukturaufklärungsmethode, wobei sich in letzten Jahren der Einsatz von mehrdimensionalen NMR-spektroskopischen Methoden immer mehr durchgesetzt hat.(27)

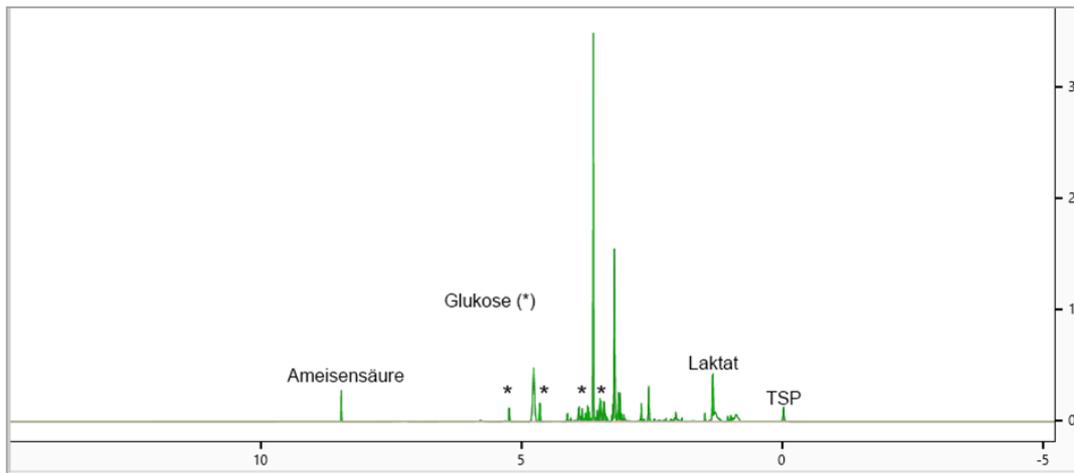


Abbildung 5: Typisches Plasma-NMR-Spektrum aus der GCKD-Studie.

Bei 1D Spektren werden die Daten auf einer Frequenzachse dargestellt und bei 2D-NMR Spektren werden die Intensitäten in Abhängigkeit von zwei Frequenzachsen aufgezeichnet, was dreidimensionale Diagramme generiert.(28) Es werden Kopplungen zwischen den einzelnen Kernen sichtbar gemacht, was mehr Informationen über Moleküle liefert und darüber hinaus bei der Strukturbestimmung von besonders komplexen Molekülen nützlich ist.(27) Allerdings sind die Messzeiten wesentlich länger und sehr kleine Signale sind kaum sichtbar, da 2D-NMR Spektren weniger empfindlich sind.

## ii. Physikalischer Hintergrund der NMR-Spektroskopie

In der NMR-Spektroskopie wird das Verhalten der Atomkerne, die einen Kerndrehimpuls ( $P$ ) und einen magnetischen Moment ( $\mu$ ) besitzen, in einem statischen Magnetfeld erfasst. Viele Atomkerne wie z.B. der des Wasserstoffatoms  $^1\text{H}$  weisen einen Kernspin auf. Dieser Drehimpuls bzw. Kernspin ist von der Planck'schen Konstante ( $\hbar$ ) und der Kernspinquantenzahl ( $I$ ) abhängig.(26) Die häufig vorkommenden Isotope  $\text{C}12$  und  $\text{O}16$  haben keinen Kernspin ( $I=0$ ), weshalb sie nicht spektroskopierbar sind.

Mit dem Vorhandensein eines Kernspins ist gleichzeitig ein magnetisches Feld assoziiert, das proportional zum Kernspin ist. Bei Abwesenheit eines äußeren Magnetfelds ist die Ausrichtung beliebig und alle Kernzustände besitzen die gleiche Energie.(29),(22) Wird ein äußeres, statisches Magnetfeld erzeugt, können die Kerne

sich parallel, was energetisch günstiger ist, oder antiparallel orientieren. In einem homogenen Magnetfeld können Kerne  $2I + 1$  Orientierungen bzw. Niveaus einnehmen, auch Kern-Zeeman-Niveaus genannt.(22) Die Isotope  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  besitzen eine Kernspinquantenzahl  $I = 0,5$  und haben somit 2 Energiezustände. Um zwischen den Energiezuständen zu wechseln, muss dem Kern Energie die der exakten Differenz von energiearmen und –reichen Zustand in Form von elektromagnetischer Strahlung bestimmter Frequenz zugeführt werden zugeführt werden.(26) Die Frequenz der Strahlung kann berechnet werden und entspricht der Präzessionsfrequenz, die direkt proportional zur Magnetfeldstärke ist. Sobald mit der entsprechenden Frequenz eingestrahlt wird, kommt es zur Resonanz und der Energiebetrag wird absorbiert. Abschließend induzieren die angeregten Kerne in einer Empfangspule ein sinusförmiges Signal dessen Frequenz der Präzessionsfrequenz der Kerne entspricht. Dieses Signal wird aufgezeichnet und mit einer Fouriertransformation in ein Frequenzsignal umgewandelt.

Zur Analyse organischer Moleküle sind die Resonanzen der Isotope  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  am wichtigsten. In der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie wird das Absorptionsverhalten der  $^1\text{H}$ -Kerne beschrieben.

Die Kerne fallen nach der Anregung in den energieärmeren Zustand zurück und geben die absorbierte Energie in Form von Wärme ab. Die Rückkehr in den ursprünglichen Zustand wird Relaxation genannt. Der Betrag der Energie für die Resonanz ist von der elektronischen Umgebung der Kerne und damit von der Art der chemischen Bindung, sowie dem chemischen Umfeld abhängig.(30),(22) Je nach Elektronenverteilung benachbarter Atome oder Atomgruppen kommt es zu unterschiedlich starker Abschirmung der betroffenen Kerne, was in unterschiedliche Resonanzfrequenz resultiert. Eine erhöhte Elektronendichte führt zu einer erhöhten Abschirmung und deshalb muss die eingestrahlte Frequenz angepasst d.h. verringert werden. Im Falle einer Verringerung der Elektronendichte durch benachbarte Atome oder Atomgruppen muss die eingestrahlte Frequenz entsprechend erhöht werden, um die Kernresonanz herbeizuführen.(26),(29)

Zur eigentlichen Messung wird das Impuls-Verfahren angewendet, bei der gleichzeitig alle Kerne einer Sorte durch einen Hochfrequenzimpuls angeregt werden. Daraus ergibt sich eine Magnetisierung der Kernspins in der Transversalebene senkrecht zum

Hauptmagnetfeld und wenn der Impuls aussetzt, oszillieren/schwingen die Kerne mit ihrer eigenen Frequenz senkrecht in der Transversalebene. Die Länge des Impulses hängt von der gewünschten Spektrenbreite ab.(26)

Die Quermagnetisierung wird vom Receiver des Spektrometers gemessen, wobei sie durch Relaxationsprozesse abnimmt und das aufgenommene Signal langsam schwächer wird und abfällt. Dieses schwächer werdende Signal wird auch freier Induktionsabfall (free induction decay „FID“) genannt. Der Informationsgehalt des gemessenen Spektrums umfasst die entsprechenden Resonanzfrequenzen und deren Intensitäten und wird in einem Interferogramm dargestellt. Um diese Rohdaten analysieren zu können, muss das in der Zeitdomäne aufgenommene Signal mittels der Fourier Transformation (FT) zuerst umgerechnet werden, um ein Frequenzspektrum zu erhalten (Abbildung 6). Anschließend können die Spektren nach weiteren Verarbeitungsschritten am Computer mit entsprechenden Programmen ausgewertet werden.(31)

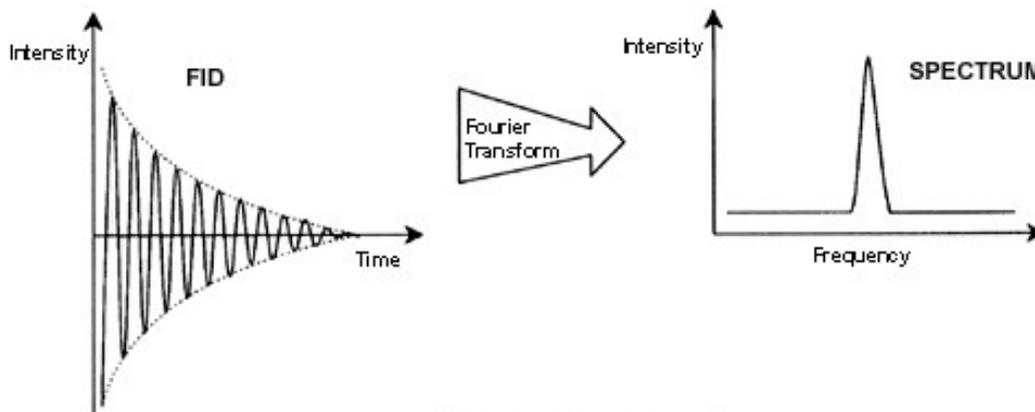


Abbildung 6: FID Signal: Intensität variiert mit der Zeit; Spektrum: Intensität variiert mit der Frequenz. Quelle: AVANCE Beginners Guide, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen

### iii. Relevanz in der medizinischen Analytik

Die moderne Medizin ist in ihrem Verständnis von Physiologie des gesunden Organismus und Pathophysiologie von Erkrankungen längst in den Bereich der molekularen Inhaltsstoffe vorgedrungen. Die Erfassung zahlreicher chemischer Moleküle stellt die Grundlage von Forschung und klinischer Arbeit am Patienten dar.

Um diesen Anforderungen gewachsen zu sein, muss ein analytisches Verfahren mehrere Kriterien erfüllen:

- Nachweis auch niedriger Konzentrationen von Inhaltsstoffen
- Hohe Reproduzierbarkeit und Präzision in der Bestimmung
- Möglichst hohes Spektrum möglicher Analyten in einer Probe unklarer Zusammensetzung, um auch als Suchverfahren geeignet zu sein
- Unkomplizierte Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung von Probenmaterial

Letztlich reiht sich die NMR-Spektroskopie damit als hervorragendes Verfahren in der experimentellen und speziellen Analytik ein, jedoch derzeit noch nicht als Werkzeug der alltäglichen klinischen Chemie. Wir haben uns das Verfahren zunutze gemacht, um ein breites Spektrum von Inhaltsstoffen mit klinischer Relevanz in einem Untersuchungsgang zu erfassen und zu quantifizieren, sowie mit klinischen Daten zu korrelieren.

## **2. Material und Methoden**

### **a. Patientenselektion**

#### **i. GCKD-Studie**

Die German Chronic Kidney Disease (GCKD) Studie ist eine prospektive Beobachtungsstudie mit gesammelten Daten und Biomaterialien (DNA, Serum, Plasma und Urin) von 5217 Patienten.(32) Sie wurde als weltweit größte CKD-Kohortenstudie Europas konzipiert, um valide Assoziationen und Rückschlüsse zwischen Biomarkern, Krankheitsprogression und Komplikation zu ermöglichen.(33) Durch die evidenzorientierte Datenerhebung vom Verlauf der chronischen Nephropathien, sowie relevante Informationen über soziodemographische Faktoren, medizinische und familiäre Hintergründe, Medikation, Lebensqualität und Komorbiditäten, können neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen werden. Folglich kann diese Studie als Grundlage für verbesserte Diagnostik, Prognose und spezifische Therapie verwendet werden.(34)

Die Patienten mussten zwischen 18-74 Jahre alt sein und als weiteres Einschlusskriterium der Studie, eine eGFR von 30-60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> und/oder eine Albuminurie > 300 mg/g Kreatinin vorweisen. Zu den Ausschlusskriterien zählen eine aktive Krebserkrankung oder Patienten mit Organtransplantationen, Herzversagen und nicht-hellhäutiger Abstammung.(35),(33) Unserem Institut steht als Teilnehmer der Studie der Zugriff auf diese Daten und Materialien datenschutzkonform zur Verfügung.

## **ii. Auswahlkriterien der Studiengruppen**

Alle Patienten der GCKD-Studie stellten die Basispopulation dar (n=5217), ihre Charakteristika (Tabelle 2) standen als elektronischer Datensatz zur Verfügung. In mehreren Schritten wurden die Patienten nun im Sinne der Einschlusskriterien für unsere Arbeit ausgewählt:

1. Vorhandensein eines Diabetes mellitus („Ja“ in einem der beiden binär erfassten Felder für Typ 1 und Typ 2 Diabetes im Datensatz der GCKD-Studie)
2. Keine Proteinurie zum Ausgangszeitpunkt 0 (Albuminwert im Studiendatensatzfeld A1 < 30). Im Weiteren wurden aus dieser Untergruppe alle Patienten selektiert, für die ein erfasster Proteinuriewert nach vier Jahren vorlag
3. Anschließend wurden die Patienten mit geringer (A2=30-300) oder starker Proteinurie (A3≥300) selektiert.
4. Als Vergleichspopulation für diese Gruppe wurden unter den verbliebenen Patienten ohne Proteinurie (A1<30) eine gleiche Zahl von Patienten zufällig so ausgewählt, dass eine statistisch nicht signifikant abweichende Geschlechtsverteilung und Altersverteilung bestand.

GCKD-STUDIE CHARAKTERISTIKA	MÄNNER		Frauen		TOTAL (n=5217)
	Diabetiker (n=1229)	Nicht- Diabetiker (n=1903)	Diabetiker (n=615)	Nicht- Diabetiker (n=1470)	
	Zahl (n) oder Mittelwert (M)				
Alter in Jahren (M)	64.9	58.3	64.0	56.7	60.1
<b>FAMILIENANAMNESE</b>					
Schlaganfall (n)	428	598	236	554	1816
Myokardinfarkt (n)	380	657	244	586	1867
Bluthochdruck (n)	740	1105	414	1018	3277
Diabetes (n)	689	652	381	666	2388
Nierenerkrankung (n)	257	436	173	446	1312
Nierensteine (n)	76	136	52	142	406
Dialyse (n)	56	113	29	110	308
Nierentransplantation (n)	4	26	5	49	84
<b>TABAKKONSUM</b>					
derzeitiger Raucher (n)	183	329	87	229	828
ehemaliger Raucher (n)	738	900	171	433	2242
Nicht-Raucher (n)	306	667	356	802	2131
Krankenhausaufenthalt in den letzten 5 Jahren (n)	966	1343	487	1017	3813
<b>ANTHROPOMETRISCHE DATEN</b>					
Größe in cm (M)	175.2	177	162.9	164	171.2
Gewicht in kg (M)	98	89.8	88.7	75.4	87.6
BMI kg/m <sup>2</sup> (M)	32	28.6	33.4	28.1	29.8
BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> (n)	723	587	409	474	2193
BMI > 25 bis ≤ 30 kg/m <sup>2</sup> (n)	378	893	137	478	1886
BMI ≤ 25 kg/m <sup>2</sup> (n)	115	406	64	499	1084
<b>PULS UND BLUTDRUCK</b>					
Puls in bpm (M)	70.6	69.2	72.6	71.3	70.5
Systolischer Wert mmHg (M)	143.8	140.3	138.6	135.2	139.5
Diastolischer Wert mmHg (M)	76.4	81.2	75.9	80.6	79.3
MAD mmHg (n)	98.9	100.9	96.8	98.8	99.3
Blutdruck < 130/80 mmHg (n)	275	443	191	466	1375
Blutdruck < 140/90 mmHg (n)	529	954	333	883	2699
<b>NIERENWERTE</b>					
Serumkreatinin in mg/dL (M)	1.7	1.7	1.3	1.3	1.5
Serum Cystatin C in mg/L (M)	1.6	1.5	1.6	1.4	1.5
eGFR (MDRD) mL/min*1,73m <sup>2</sup> (M)	45.6	47.3	43.9	49.3	47.1
eGFR ≥ 60 (n)	155	303	72	308	383
eGFR 45-59 (n)	422	668	177	484	1751
eGFR 30-44 (n)	497	743	269	536	2045
eGFR < 30 (n)	136	175	87	129	527
U-Albumin/Kreatinin Ratio (M)	76.4	76.9	21.1	33.9	50.9
<b>UACR in mg/g</b>					
UACR < 30 (n)	454	698	337	702	2191
UACR 30-300 (n)	359	594	157	383	1493
UACR >300 (n)	394	585	104	362	1445
<b>ANTHYPERTENSIVA, DIURETIKA</b>					
ACE-Hemmer (n)	586	906	259	515	2266
Angiotensin-II-Antagonist (n)	395	650	195	461	1701
ACE-Hemmer und Angiotensin-II- Antagonist kombiniert (n)	92	152	27	61	332
ACE-Hemmer oder Angiotensin-II- Antagonist (n)	1073	1708	481	1047	4299
Diuretika (n)	846	797	412	505	2560
> Thiazide (n)	221	213	96	113	643
> Aldosteronantagonist (n)	140	129	66	92	427
> Schleifendiuretika (n)	715	591	341	352	1999
Kalziumkanalblocker (n)	556	638	240	334	1768
Betablocker (n)	854	956	407	642	2859
Nierenbiopsie (n)	163	662	69	472	1366

\*Anzahl der fehlenden Werte war < 2% für alle Parameter; Ausnahme: Familienanamnese (6-12%). Bei 6,2% der Studienteilnehmer lagen keine Daten zur Medikation vor, darunter auch Patienten ohne Rezept.

Tabelle 2: Charakteristika GCKD-Studie; Quelle: Titze S, Schmid M, Kottgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant* (2015) 30:441-451, doi:10.1093/ndt/gfu294

### **iii. Erfasste Patientendaten**

Aus dem ausgewählten Datensatz (Gruppe mit Proteinurie n=114, Gruppe ohne Proteinurie n= 109) wurden folgende Patientendaten für unsere Analyse exzerpiert (weitere Details folgen im Ergebnisteil, Kapitel 3a Patientenselektion):

1. Alter (in ganzen Jahren)
2. Geschlecht (M/W)
3. Proteinurie zum Baselinezeitpunkt 0 (mg/dl)
4. Proteinurie nach 4 Jahren (mg/dl)

### **b. Probenmaterial und Aufbereitung**

Die für die Promotion verwendeten NMR-Messungen entstammen aus dem Institut für funktionelle Genomik Regensburg. Die gesammelten Biomaterialien (gefroren bei -80 Grad Celsius) wurden von der Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg, die offiziell auch als Standort gilt, aus dem Materialpool der GCKD-Studie zugesendet. Für die Vorbereitung der Proben für die Messung war die medizinisch-technische Laborassistentin Claudia Bogner zuständig.

Bei den Baseline Plasma GCKD-Proben wurden im Jahr 2013 250 µl Puffer (pH-Wert von 7,4 und 50 µl einer 0,75 prozentigen Lösung des Natriumsalzes der Trimethylsilylpropionsäure (TSP) in D<sub>2</sub>O vermischt) auf 400 µl Plasma vorgelegt und dann 10 µl einer 81,97 mM Ameisensäure als Referenzsubstanz hinzugegeben. Auf 400 µl Probebezogen entsprach dies einer Konzentration der Ameisensäure von 2,05 mM. Das Filtern des Plasmas, um Proteine und Fettbestandteile zu entfernen, wurde aufgrund der hohen Anzahl an Proben und dem damit verbundenen Aufwand an Zeit und Kosten verzichtet. Stattdessen wurde für die Messung der Spektren eine sogenannte CPMG Pulssequenz verwendet, mit der die Signale von Makromolekülen wie Proteinen unterdrückt werden.

Bei den Baseline Urin GCKD-Projekt 2019-2020 hat Frau Bogner gleich den Puffer mit Formic acid versetzt, weshalb sie 260 µl davon vorgelegt und 400 µl Urin zugeben hat.

240 mM Ameisensäure wurden hergestellt und dann zu dem Puffer dazu gegeben, so dass die Konzentration in der Probe 6 mMol betrug.

Trimethylsilylpropionsäure (TSP) und Ameisensäurelösung fungieren üblicherweise als Referenzsubstanzen in den Plasma- und Urinproben, wobei erstgenanntes eine beachtliche Wechselwirkung mit Proteinen aufweist. Daher wurde Ameisensäure, die keine Proteinbindung hat, als Referenzsubstanz für die Quantifizierung der Plasmaproben in der Promotionsarbeit verwendet. TSP wurde als Referenzsubstanz bei den Urinproben verwendet, da zu dem Baselinezeitpunkt 0 die Proteinmenge im Urin minimal vorkommen. (Darüber hinaus ist im menschlichen Organismus im Gegensatz zur Ameisensäure kein endogenes TSP vorhanden, weshalb die jeweiligen Metaboliten unverfälscht quantifiziert werden können.)

### **c. Auswahl der Metaboliten in Blutplasma**

Folgende 25 Metaboliten wurden ausgewählt, da sie aufgrund der klaren Signale im NMR-Spektrum fehlerfrei/gut von den Analyseprogrammen ausgewertet werden können:

- 1) 3-Hydroxybutyrat
- 2) Acetat
- 3) Acetoacetat
- 4) Aceton
- 5) Alanin
- 6) Asparagin
- 7) Betain
- 8) Carnitin
- 9) Kreatin
- 10) Kreatinin
- 11) Dimethylamin
- 12) Glukose
- 13) Glutamin
- 14) Glycin

- 15) Histidin
- 16) Isobutyrat
- 17) Isoleucin
- 18) Laktat
- 19) Phenylalanin
- 20) Prolin
- 21) Pyruvat
- 22) Theronin
- 23) Trimethylamin-N-oxid
- 24) Tyrosin
- 25) Valin

#### **d. Analyseverfahren**

##### **i. NMR-Spektroskopie**

Die für die Promotion verwendeten 1D Plasma-NMR-Spektren wurden bereits im Jahr 2013 im Institut für funktionelle Genomik in Regensburg mittels dem Bruker Avance III HD 600 Mhz NMR Spektrometer von der Firma Bruker (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, DE) gemessen. Die 1D Urin-NMR-Spektren wurden 2019 bis 2020 vermessen.

Es wurde bei jeder Probe eine CPMG-Sequenz (Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz) verwendet, da die großen Linienbreiten der Proteinsignale die Auswertung anderer Signale stören würden. Diese weit verbreitete Methode wird auch zur Bestimmung der Spin-Spin-Relaxationszeit T<sub>2</sub> eingesetzt, was hier allerdings nicht zur Anwendung kam.<sup>(36)</sup> Unerwünschte Signalüberlagerungen können verhindert werden, indem die Signale (im weiteren Verlauf als Peak bezeichnet) von Makromolekülen, die üblicherweise sehr kurze Relaxationszeiten aufweisen, unterdrückt werden. Moleküle mit mittellanger Relaxationszeit werden lediglich reduziert und kleinere Moleküle (meist Metaboliten des Stoffwechsels) mit langer Relaxationszeit werden nur gering beeinflusst.

## **ii. Softwarebasierte Auswertung der NMR-Spektren**

### **1. Auswahl der Softwareverfahren**

Für die beiden Studienteile Plasma und Urin wurden entsprechend der verschiedenen Fragestellungen geeignete Softwareanalyseverfahren ausgewählt.

Bei der Auswertung der Plasma-NMR-Spektren wurde die Software Chenomx verwendet. Diese ermöglicht in dem Spektrum manuell die Lorenzkurve für bekannte Spektralbereiche der 25 Studienmetabolite zu setzen, welche dann halb-automatisch quantifiziert werden.

Im zweiten Teil der Studie ging es im Sinne einer Screeningstudie im Probenmaterial Urin mögliche Metaboliten zu identifizieren. Für diese Fragestellung war die aufwändige manuelle Analyse einzelner bekannter Metaboliten mittels der Software Chenomx nicht gut geeignet, weshalb wir uns für die Auswertung der Urin-NMR-Spektren für die Software AMIX entschieden haben.

Diese unterteilt das gesamte erfasste Spektrum in 900 Buckets von je 0,01 ppm Frequenzbreite, die dann automatisiert integriert werden.

Die Messwerte beider Gruppen wurden für einen statistischen Vergleich tabellarisch erfasst. In einem zweiten Schritt können signifikant abweichende Frequenzbereiche dann mit bekannten Referenzwerten für zahlreiche Metaboliten verglichen werden und somit im Sinne eines Screeningverfahrens Hinweise für aussagekräftige Metaboliten gewonnen werden. Im Weiteren werden beide softwarebasierten Verfahren detailliert dargestellt.

### **2. Quantitative Auswertung mit Chenomx - Plasmaproben**

Die Auswertung der Plasma-NMR-Spektren wird mit dem Programm Chenomx (Version: nmr suite 8.3 Standard) vorgenommen. Das Programm wurde von der Kanadischen Firma Chenomx Inc. seit 2001 entwickelt und umfasst 4 Module: Profiler, Library Manager, Processor, Compound Builder und Spin Simulator.

Für das Auswerten der Proben wurden lediglich der Module Processor, mit dem man vor der Analyse der Spektren bestimmte Parameter einstellt und der Profiler, mit dem die Spektren analysiert werden, eingesetzt. Mittels Computeralgorithmen und

gesammelten Spektraldaten im Library Manager können Metaboliten innerhalb der NMR-Spektren identifiziert und quantifiziert werden.(37) Die Software entschlüsselt mit Hilfe von automatisierten Prozessen die Spektralsignale der Komponenten in der entsprechenden Probe und bei überlappenden Spektralbereichen werden Peaks von bekannten Metaboliten herausgerechnet und verbleibende Peaks sichtbar gemacht. Diese können dann mit anderen Komponenten verglichen werden.

Folgende Parameter im Chenomx Prozessor mussten vor der Quantifizierung der NMR-Spektren mit bekanntem pH-Wert eingestellt werden: Art und Konzentration der Referenzsubstanz (Chemical Shape Indicator, CSI) und den pH-Wert der Probe. Vor der Kalibrierung im Profiler wird "Formate" mit einer Konzentration von 2,05 mM angegeben und bei "Sample pH" wird  $7,0 \pm 0,5$  gewählt.

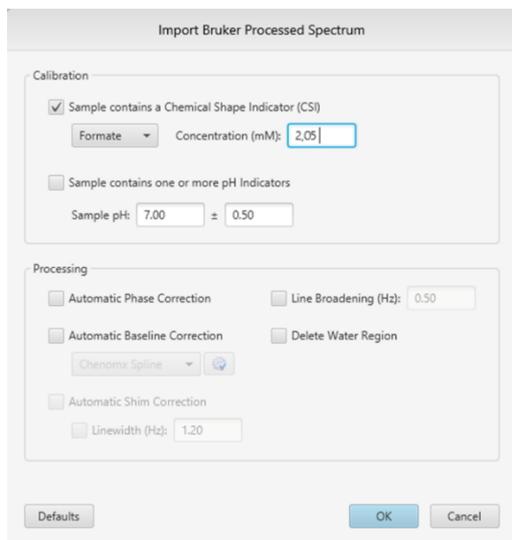


Abbildung 7: Art und Konzentration der Referenzsubstanz.

Der CSI konnte nicht vom Programm automatisiert kalibriert werden kann, da dies für Ameisensäure bei Chenomx vom Programm her nicht vorgesehen ist und kleinste Änderungen im pH-Wert und Salzgehalt der Referenzsubstanz die Kurve verschieben. Daher haben wir bei jeder Probe den Peak der Referenzsubstanz zwischen 8,5 - 8,45 ppm manuell angepasst. Die Vorgabe war, den Peak so zu verschieben, dass die rot eingefärbte Fläche oberhalb und die freie weiße Fläche unterhalb der schwarzen Linie visuell in etwa den gleichen Flächenanteil haben, damit das Programm später die richtigen Konzentrationswerte errechnen kann.

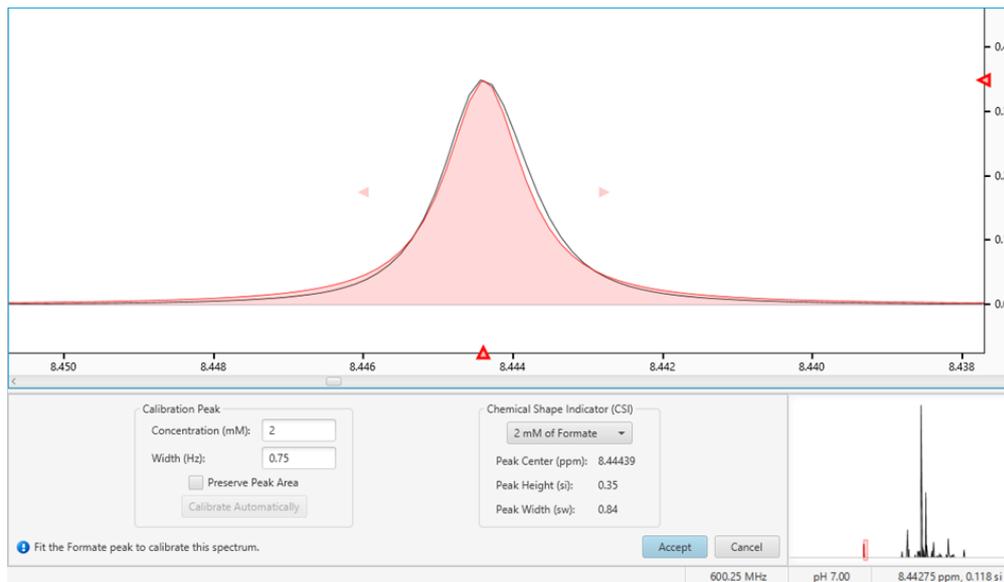


Abbildung 8: Kalibrierung der Referenzsubstanz mit Chenomx.

Nachdem die Einstellungen bestätigt wurden, kann zu dem Chenomx Profiler gewechselt und die gewünschten Metaboliten automatisch angepasst werden. Weiterhin mussten die automatisch angepassten Peaks und dadurch errechneten Werte einzeln überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden, indem die Lorenzkurve manuell verschoben wird. Einige Metaboliten weisen nicht nur einen, sondern mehrere Frequenzbereiche auf, die mit den Peaks des Spektrums übereinstimmen. In der folgenden Tabelle sind die jeweiligen vorrangigen Referenzfrequenzen in ppm angezeigt (vom Institut für funktionelle Genomik in Regensburg durch Spike-in-Versuche festgelegt). Für den jeweiligen Metaboliten wird nun die berechnete Konzentration quantitativ bestimmt. Wir haben in den Spektren insgesamt 25 Metabolite quantifiziert.

METABOLITE	Referenzfrequenz (ppm)
3-Hydroxybutyrat	1.19
Acetat	1.91
Acetoacetat	2.27
Aceton	2.22
Alanin	1.47
Asparagin	2.84
Betain	3.25
Carnitin	3.22
Kreatin	3.03
Kreatinin	4.04
Dimethylamin	2.71
Glukose	5.22
Glutamin	2.44
Glycin	3.55
Histidin	7.05
Isobutytrat	1.06
Isoleucin	1.00
Laktat	1.32
Phenylalanin	7.41
Prolin	2.02
Pyruvat	2.36
Threonin	4.24
Trimethylamin-N-oxid	3.25
Tyrosin	6.89
Valin	1.03

Tabelle 3: 25 Metaboliten und ihre jeweilige Leit-Referenzfrequenz in ppm. Es wird immer die Position des hauptsächlich zur Quantifizierung verwendeten Signals angegeben.

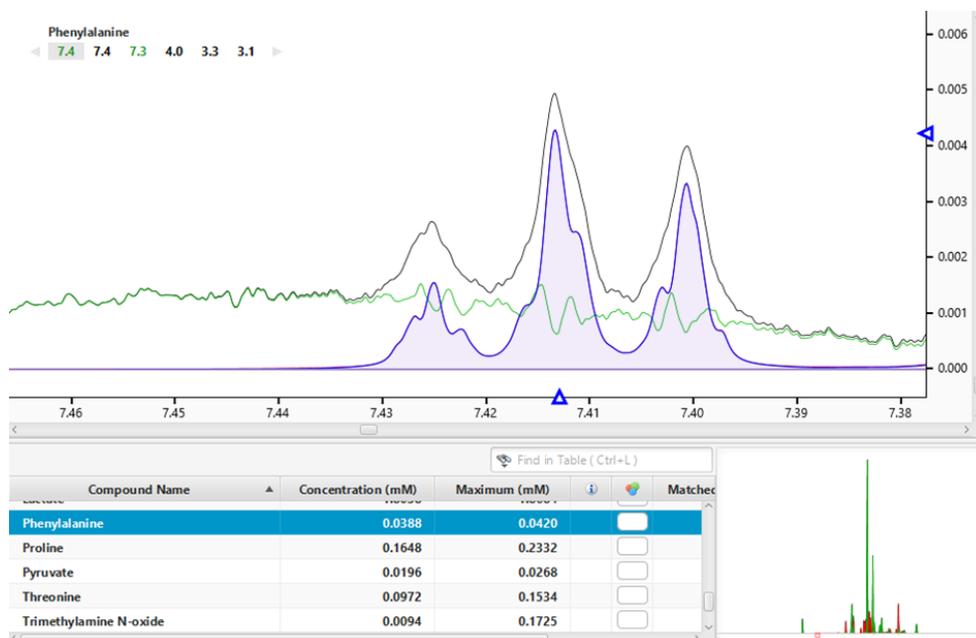


Abbildung 9: Beispiel Phenylalanin am Pat. 8 Gruppe „MIT“ Proteinurie; Einpassung der Lorentz Kurve in das gemessene 1D 1H Plasma Spektrum.

### 3. Bucketing mit AMIX - Urinproben

Die Urinproben wurden mit dem Programm AMIX in der Version 3.9.13 analysiert. Die Software AMIX wurde von der Firma BioSpin GmbH Rheinstetten in Deutschland entwickelt und besteht aus den zusammenhängenden Modulen AMIX Viewer und AMIX Tools. Mit dem „Viewer“ lassen sich NMR, MS, LC-MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) und UV-Daten, sowie Molekülstrukturen bildlich darstellen. Mit AMIX Tools können unterschiedliche Handlungen, wie Strukturnachweis, Metabolitenanalyse, Spektrenabgleich, Datenaufbereitung und Statistikanwendungen, ausgeführt werden. AMIX lässt sich ähnlich wie Chenomx bedienen, mit dem Unterschied, dass erstgenanntes eine gleichzeitige Darstellung von mehreren eingelesenen NMR-Spektren zulässt. Eine weitere Funktion der „Tools“ ist das Bucketing. Das Programm unterteilt alle Spektren beider Gruppen in eine Vielzahl an sogenannten Buckets, deren Breite jeweils 0,01 ppm beträgt. Die Spektren werden sozusagen zerschnitten und in gleichmäßige Intervalle unterteilt. Die Software analysiert nun die Datenpunkte der eingelesenen Spektren in den getrennten Intervallen und die Summe der Datenpunkte/Einzelwerte ergibt den Bucketwert.

Der Wert kann negativ werden, wenn sich die Datenpunkte unterhalb der festgelegten Null-Linie in dem Spektrum befinden.

Der Vorteil in dieser Vorgehensweise liegt darin, dass sich zwischen mehreren Gruppen signifikant unterscheidende Bereiche mittels statistischer Tests ermittelt werden können, auch wenn zuvor keine Identifizierung und/oder Quantifizierung von Metaboliten vorgenommen wurde. Allerdings können die Bucketwerte nicht zur Ermittlung der Konzentration von Metaboliten eingesetzt werden, selbst wenn die Referenzfrequenz eines Stoffes genau in den Bereich fällt. Der Umstand ist mit der Tatsache zu erklären, dass in den meisten Fällen mehrere Metaboliten in besagten Bereichen überlagert sind und/oder die Breite des Signals eines Metaboliten die Bucketbreite übertrifft.

Allgemein beträgt die Länge der Frequenzachse der analysierten 1D  $^1\text{H}$  NMR Spektren 9,5 - 0,5 ppm, wobei der Bereich von 4,9 - 4,7 ppm, der das Wasser-Restsignal enthält, ausgespart wurde. Nachdem die Spektren aller Proben eingelesen wurden, erstellten wir über die Programmfunktion in AMIX einen tabellarisch elektronischen Datensatz.

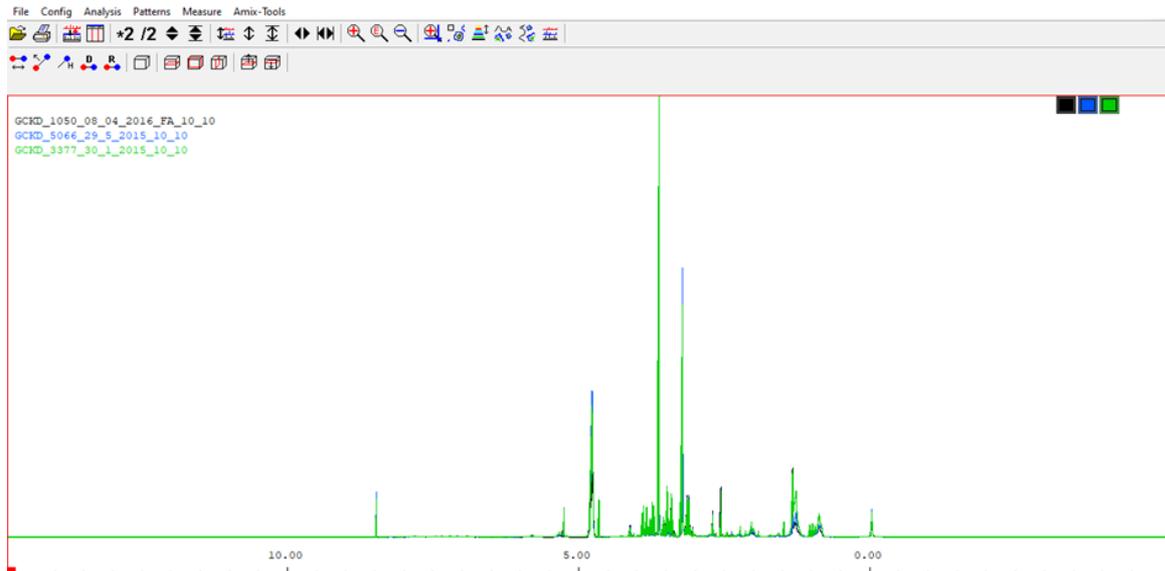


Abbildung 10: NMR-Spektren der Patienten 5,6,7 aus der Gruppe „MIT“ überlagert mit AMIX dargestellt.

## e. Datenerfassung und statistische Auswertung

Nachdem mit Hilfe von Chenomx 25 Metabolite in Plasma NMR-Spektren quantifiziert wurden, wurde eine Excel Tabelle aus den gewonnenen Daten (Angabe der Konzentration in mMol) erstellt. Anschließend wurde mit den integrierten Excel Funktionen für jeden Metabolit beider Gruppen ein Mittelwert (MITTELWERT), die Standardabweichung (STABW) und die relative Standardabweichung (REL.STABW) berechnet. Abschließend wurde der T-Test durchgeführt. Dazu wurden die in Excel integrierten Funktionen verwendet.

Die Urin-NMR-Spektren wurden mittels AMIX in Buckets (Bucketbreite: 0,01 ppm) unterteilt und nachdem eine weitere Tabelle erstellt wurde, ebenfalls der T-Test berechnet. Anschließend wurden die p-Werte aus dem T-Test noch für multiples Testen korrigiert.

### 3. Ergebnisse

#### a. Patientenselektion

Gemäß der genannten Einschlusskriterien (siehe Abschnitt 2.a.ii) wurde für die Auswahl der Studienpatienten schrittweise vorgegangen. Die Schritte sind grafisch in Abbildung 11 dargestellt.

Von 5217 Patienten der GCKD-Studie qualifizierten sich 1879 Diabetiker (Männer n=1229, Frauen n=615), hierunter wurden Patienten ohne Proteinurie zum Zeitpunkt 0, die nach vier Jahren eine Proteinurie vorweisen ausgewählt. Unter diesen fanden sich 109 mit geringer und 14 mit starker Proteinurie, die gemeinsam die Studiengruppe mit Proteinurie (n=123) bildeten, im Weiteren abgekürzt als „MIT“. Dazu wurde die zahlengleiche Studiengruppe ohne Proteinurie nach vier Jahren nach dem Zufallsprinzip gematcht, im Weiteren „OHNE“, bis keine signifikante Abweichung von Geschlechtsverteilung und Alter mehr bestanden. Die Charakteristika der beiden Gruppen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Im Verlauf der Auswertung der NMR-Spektroskopiedaten fanden sich fehlende oder implausible Angaben der Referenzsubstanz Ameisensäure, so dass eine zuverlässige Bewertung der Daten nicht möglich war. Diese Patienten (n=19) wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen. Final blieben in der Gruppe MIT 114 und in der Gruppe OHNE 109 Patienten übrig.

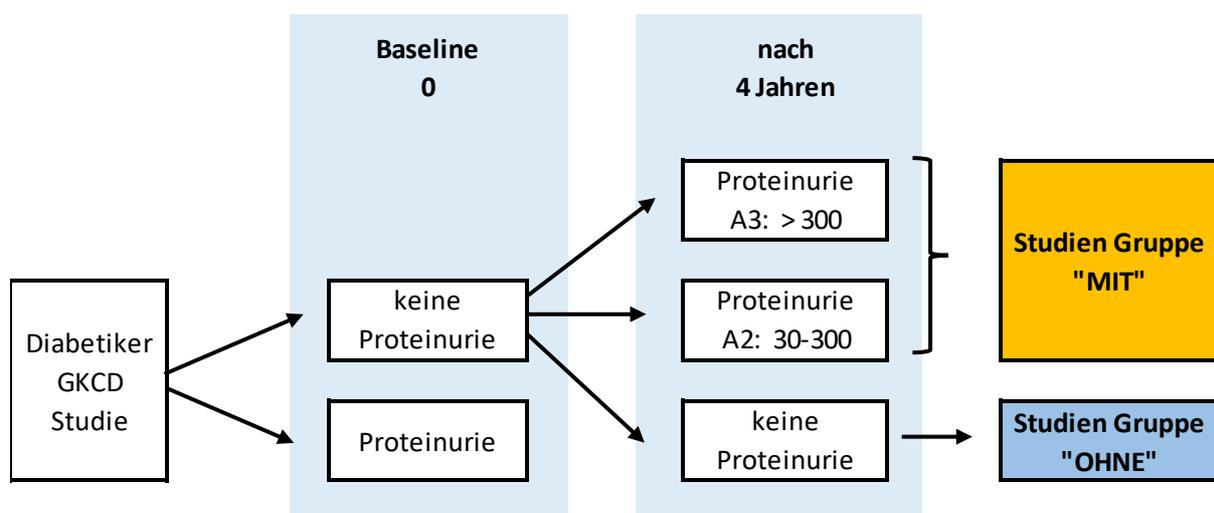


Abbildung 11: Auswahl der Studienpatienten.

	Alter(Mittelwert)	Geschlecht* (Mittelwert)	Ausschluss**	Finale Zahl
MIT	64,5	0,3	n=8	n=114
OHNE	65,2	0,42	n=13	n=109

\* ♂=0; ♀=1, \*\*wegen fehlender Referenzsubstanz

Tabelle 4: Charakteristika der Studiengruppen.

## b. Ergebnisse der NMR-Spektroskopie Blutplasma

### i. Plasmanalyse mit CHENOMX

Jeder Datensatz eines Patienten wurde gemäß Protokoll auf 25 Metaboliten untersucht und die Konzentrationswerte wurden in mMol/L in einer Excel Tabelle erfasst. Bei den Patienten 2;4;35 und 100 aus der Gruppe MIT und 54;61;64 und 105 aus der Gruppe OHNE war der Dilutionsfaktor des Probenmaterials „1,33“ statt „1“, weshalb die Konzentrationswerte entsprechend umgerechnet wurden.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 5) sind Mittelwert, Standardabweichung (STABW) und relative Standardabweichung (REL.STABW) beider Gruppen, sowie der T-Test dargestellt.

METABOLITE	MIT			OHNE			T-TEST
	MITTELWERT (mMol)	STABW	REL. STABW	MITTELWERT (mMol)	STABW	REL. STABW	
3-Hydroxybutyrat	0.044	0.044	99.9%	0.041	0.047	113.4%	0.652
Acetat	0.070	0.099	141.2%	0.081	0.161	199.2%	0.544
Acetoacetat	0.005	0.008	143.3%	0.004	0.005	116.0%	0.215
Aceton	0.037	0.026	68.2%	0.036	0.023	64.3%	0.600
Alanin	0.279	0.071	25.2%	0.280	0.069	24.5%	0.937
Asparagin	0.032	0.010	31.9%	0.032	0.010	29.7%	0.882
Betain	0.034	0.015	45.8%	0.031	0.010	33.2%	0.174
Carnitin	0.035	0.010	27.3%	0.035	0.010	27.7%	0.980
Kreatin	0.028	0.023	83.2%	0.030	0.024	80.3%	0.526
Kreatinin	0.066	0.019	28.2%	0.061	0.016	26.1%	<b>0.027</b>
Dimethylamin	0.014	0.006	45.0%	0.014	0.007	48.4%	0.877
Glukose	5.383	2.016	37.4%	5.381	1.896	35.2%	0.993
Glutamin	0.343	0.063	18.5%	0.349	0.070	20.2%	0.520
Glycin	0.153	0.043	27.8%	0.147	0.033	22.2%	0.189
Histidin	0.052	0.010	18.8%	0.053	0.011	21.5%	0.613
Isobutytrat	0.007	0.003	44.6%	0.007	0.003	43.9%	0.710
Isoleucin	0.059	0.018	30.7%	0.060	0.015	25.3%	0.597
Laktat	1.468	0.639	43.6%	1.412	0.582	41.2%	0.488
Phenylalanin	0.037	0.008	21.2%	0.040	0.008	20.0%	<b>0.018</b>
Prolin	0.198	0.064	32.1%	0.184	0.048	25.9%	0.059
Pyruvat	0.040	0.031	76.3%	0.040	0.031	76.7%	0.891
Threonin	0.096	0.025	25.8%	0.102	0.029	28.2%	0.090
Trimethylamin-N-oxid	0.009	0.010	111.6%	0.010	0.008	74.9%	0.566
Tyrosin	0.042	0.013	31.1%	0.043	0.010	24.0%	0.581
Valin	0.205	0.042	20.7%	0.210	0.040	19.1%	0.376

Tabelle 5: Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, T-Test der jeweiligen Metaboliten beider Gruppen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den abweichenden Mittelwerten der zwei Gruppen ist bei Kreatinin und Phenylalanin aufgefallen. Die rot markierten p-Werte „0,027“ und „0,018“ sprechen gegen die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten beider Gruppen gibt.

## ii. Korrektur für multiples Testen

Anschließend wurden die errechneten p-Werte für multiples Testen nach der Methode von Benjamini und Hochberg (BH) korrigiert und in einer gesonderten Tabelle (siehe Tabelle 6) zusammengetragen und nach abnehmender Signifikanz chronologisch sortiert. Keiner der korrigierten p-Werte erreichte das Signifikanzniveau ( $\leq 0,05$ ).

METABOLITE	p-Werte	
	ohne Korrektur (rawp)	nach Korrektur (BH)*
3-Hydroxybutyrat	0.019	0.260
Acetat	0.021	0.260
Acetoacetat	0.058	0.483
Aceton	0.087	0.543
Alanin	0.193	0.941
Asparagin	0.226	0.941
Betain	0.333	0.952
Carnitin	0.372	0.952
Kreatin	0.487	0.952
Kreatinin	0.516	0.952
Dimethylamin	0.523	0.952
Glukose	0.541	0.952
Glutamin	0.592	0.952
Glycin	0.592	0.952
Histidin	0.601	0.952
Isobutyrat	0.609	0.952
Isoleucin	0.677	0.954
Laktat	0.687	0.954
Phenylalanin	0.747	0.983
Prolin	0.816	0.988
Pyruvat	0.886	0.988
Threonin	0.901	0.988
Trimethylamin-N-oxid	0.919	0.988
Tyrosin	0.949	0.988
Valin	0.993	0.993

\*Korrektur für multiples Testen nach der Methode von Benjamini und Hochberg

Tabelle 6: Statistischer Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen unserer 25 Studienmetaboliten der Gruppen MIT und OHNE. Angabe der p-Werte ohne Korrektur für multiples Testen (rawp) und mit (BH).

## c. Ergebnisse der NMR-Spektroskopie Urinanalyse mit AMIX

### i. Bucketing

Das Programm AMIX generierte aus den eingelesenen Urin-Spektren insgesamt 900 Buckets mit einer jeweiligen Breite von 0,01 ppm. Das Wasser-Restsignal zwischen 4,995 - 4,615 ppm wurde dabei ausgespart. Um für Unterschiede in den globalen Metabolitenkonzentrationen durch unterschiedliche Flüssigkeitsaufnahmen zu korrigieren wurden alle Buckets auf den Bereich der Methylgruppe von Kreatinin (3,058 - 3,033 ppm) normalisiert. Die Daten wurden in einer Excel Tabelle eingetragen und nachdem der T-Test für die Buckets beider Gruppen errechnet wurde, zeigten sich 16 signifikante Buckets. Die besagten Buckets mit einer signifikanten Abweichung (p-Wert

≤ 0,05) zwischen den Gruppen MIT und OHNE wurden einzeln auf Signale überprüft. Waren dort keine Signale zu finden, gehen die beobachteten Signifikanzen nur auf zufällige Basislinienschwankungen zurück und die 12 verbliebenen Buckets mit Signalen wurden in einer gesonderten Tabelle zusammengetragen. Hierbei fällt auf, dass alle Mittelwerte der Gruppe MIT größer sind im Vergleich zu Gruppe OHNE (siehe Tabelle 7).

Referenzbereich AMIX (in ppm)	T-Test	MIT Bucket- MITTELWERT	OHNE Bucket- MITTELWERT
8.005	0.03	190316.972	151502.287
7.615	0.03	562424.578	244315.750
7.605	0.03	379325.541	186998.685
7.595	0.02	360969.826	228993.065
7.515	0.05	621505.560	526856.083
4.095	0.01	2262334.560	1938248.259
3.585	0.05	3009567.917	2694375.806
3.075	0.04	1165079.009	988245.417
2.745	0.03	725643.138	623902.917
2.725	0.01	5327336.514	4659342.843
2.225	0.02	1928894.972	1194299.991
2.195	0.02	2258575.128	1515690.880

*Tabelle 7: 12 von 900 mit der Software analysierten Buckets mit enthaltenen Signalen zeigten sich im T-Test signifikant abweichend zwischen den Gruppen MIT und OHNE.*

## ii. Korrektur für multiples Testen

Anschließend wurden die errechneten p-Werte nach der Methode von Benjamini und Hochberg (BH) für multiples Testen korrigiert und in einer gesonderten Tabelle (siehe Tabelle 8) zusammengetragen. Keiner der korrigierten p-Werte erreichte das Signifikanzniveau (≤0,05).

Referenzbereich AMIX (in ppm)	p-Werte nach Korrektur (BH)*
8.005	0.9981
7.615	0.9981
7.605	0.9981
7.595	0.9981
7.515	0.9981
4.095	0.9981
3.585	0.9981
3.075	0.9981
2.745	0.9981
2.725	0.9981
2.225	0.9981
2.195	0.9981

\*Korrektur für multiples Testen nach der Methode von Benjamini und Hochberg

*Tabelle 8: Statistischer Vergleich der Bucket-Mittelwerte der Gruppen MIT und OHNE. Angabe der p-Werte nach Korrektur für multiples Testen. (Urin-Spektren).*

### iii. Metabolitenidentifizierung mit Chenomx

Die erfassten Bereiche aus Tabelle 7 wurden auf der Frequenzachse im Spektrum lokalisiert und mit der Suchfunktion in Chenomx wurden Metaboliten vorgeschlagen, die korrespondierende Referenzbereiche aufweisen. Allerdings war eine eindeutige Zuordnung von Metaboliten nicht immer möglich.

Strukturell verwandte Metaboliten zeigen aufgrund der analogen Resonanzfrequenzen ihrer Protonen Signale an denselben Stellen im Spektrum. Die daraus resultierenden Überlappungen der Peaks werden von der Software zusammenaddiert und visuell als eine Linie (Lorenzkurve) dargestellt. An dieser Stelle kommen die Softwareprogramme an ihre Grenzen, da oft nur spekuliert werden kann, wie viele Metaboliten und in welcher Konzentration sich dort überlagern. Vielmehr schlägt die Software hier zahlreiche Substanzen (aus „Chenomx Spectral Reference Library“ bei 600MHz, n=343) mit passenden Referenzbereichen vor.

In diesem Falle haben wir für jede der vorgeschlagenen Substanzen, so denn bekannt, auch weitere angegebene Referenzbereiche überprüft. Letztlich war eine eindeutige Zuordnung nur bei den Referenzbereichen 4,095 ppm (N-Methylhydantoin) und 2,725 ppm (Dimethylamin) möglich. Für die Quantifizierung wurden die Urin-Spektren von jeweils fünf Patienten aus jeder Gruppe verwendet. Als Referenzsubstanz wurde Trimethylsilylpropionsäure TSP (Konzentration: 6,025 mmol; pH-Wert: 7,0) gewählt und die von Chenomx errechneten Konzentrationswerte können Tabelle 9 entnommen werden.

(mMol)	MIT					MITTEL WERT	OHNE					MITTEL WERT
	Pat.1	Pat.2	Pat.3	Pat.4	Pat.5		Pat.1	Pat.2	Pat.3	Pat.4	Pat.5	
Dimethylamin	0.087	0.049	0.443	0.048	0.432	0.212	0.362	0.193	0.182	0.078	0.271	0.217
N-Methylhydantoin	0.016	0.013	0.232	0.017	0.103	0.076	0.104	0.051	0.043	0.022	0.055	0.055

Tabelle 9: Konzentrationswerte und Mittelwerte von Dimethylamin und N-Methylhydantoin der Gruppe MIT und OHNE

#### iv. Hauptkomponentenanalyse mit AMIX

Als nächstes wurde mit einer weiteren Programmfunktion von AMIX eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis) durchgeführt, da die vielen hundert Buckets eine hochdimensionale Projektion ergeben und nicht graphisch darstellbar sind. Diese gebräuchliche Abbildungsmethode erlaubt eine vereinfachte graphische Darstellung der Spektren, indem der Algorithmus neue Hauptkomponenten, mit den größten Unterschieden auswählt. Die zwei Achsen (PC1 und PC2, principal component) stehen für die zwei Hauptkomponenten, die in Richtung der größten Varianz der Daten gehen. Mittels eines Loadingsdiagramms (Abbildung 13) kann aufgezeigt werden, welche der Buckets besonders zu den beiden Hauptkomponenten beitragen. Diejenigen Buckets, die besonders weit links oder rechts sind, tragen maßgeblich zur ersten Hauptkomponente (PC1) bei und Buckets, die weit oben oder unten sind, tragen entsprechend maßgeblich zur zweiten Hauptkomponente (PC2) bei.

Es findet also eine Reduktion vieler Maße auf wenige aussagekräftige Werte statt. Damit können Korrelationen einfacher sichtbar gemacht und gegebenenfalls überprüft werden.

Die Urin-Spektren aller Patienten beider Gruppen wurden in dem Softwareprogramm ausgewählt und auf „to unit variance“ skaliert, damit die Gewichtung aller Variablen

einen gleich starken Einfluss auf die PCA haben. Die Software erstellte anhand der eingespeisten Daten ein Punktdiagramm (Abbildung 12). Anschließend wurden stärker abweichende Punkte der Gruppe „MIT Proteinurie“ selektiert und überprüft, ob bei diesen Patienten eine sehr starke Proteinurie ( $A1 \geq 300$ ) vorlag. Da es nur auf zwei von 13 Patienten zutreffend war, lässt sich vermuten, dass die abweichenden Punkte nicht in Korrelation mit der Stärke der Proteinurie stehen. Insgesamt ist in der PCA keine gute Trennung zwischen den beiden beobachteten Gruppen zu sehen.

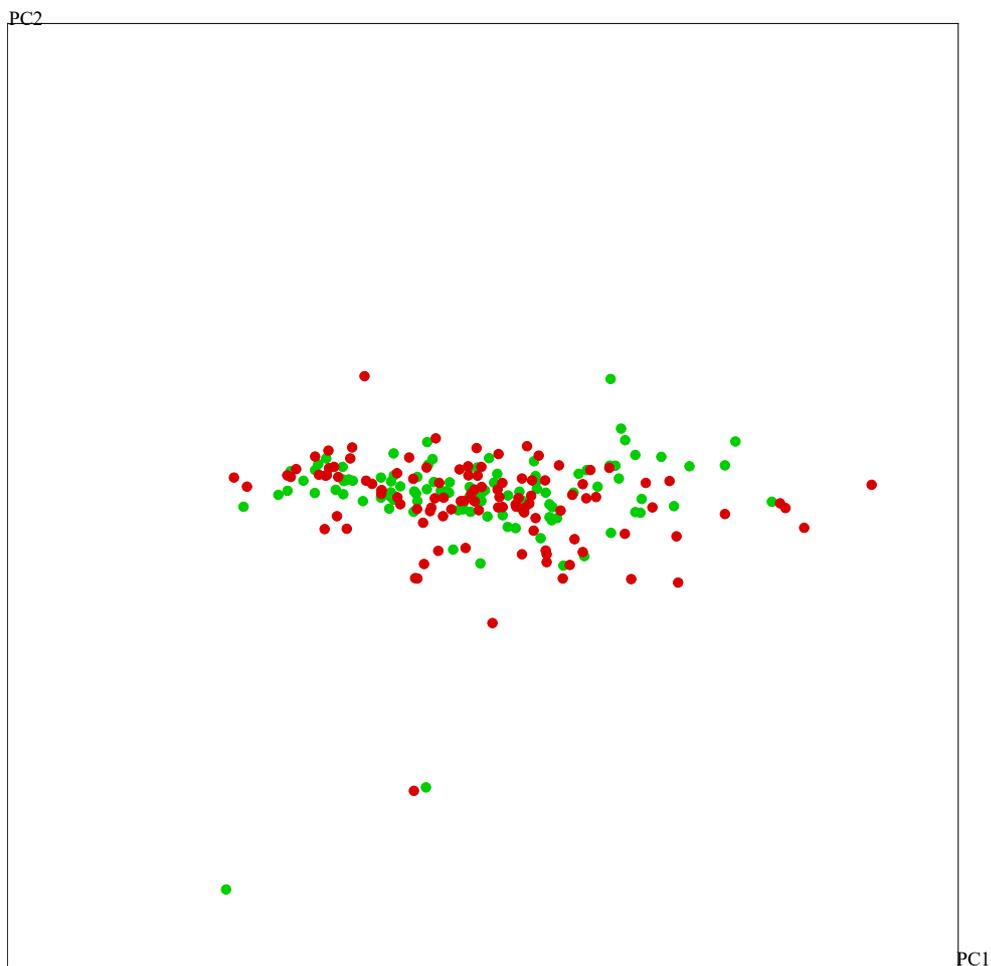


Abbildung 12: Scorematrix PCA Hauptkomponentenanalyse: Gruppe „MIT“ (Rot); Gruppe „OHNE“ (Grün); PC1= Principal component 1; PC= Principal Component 2.

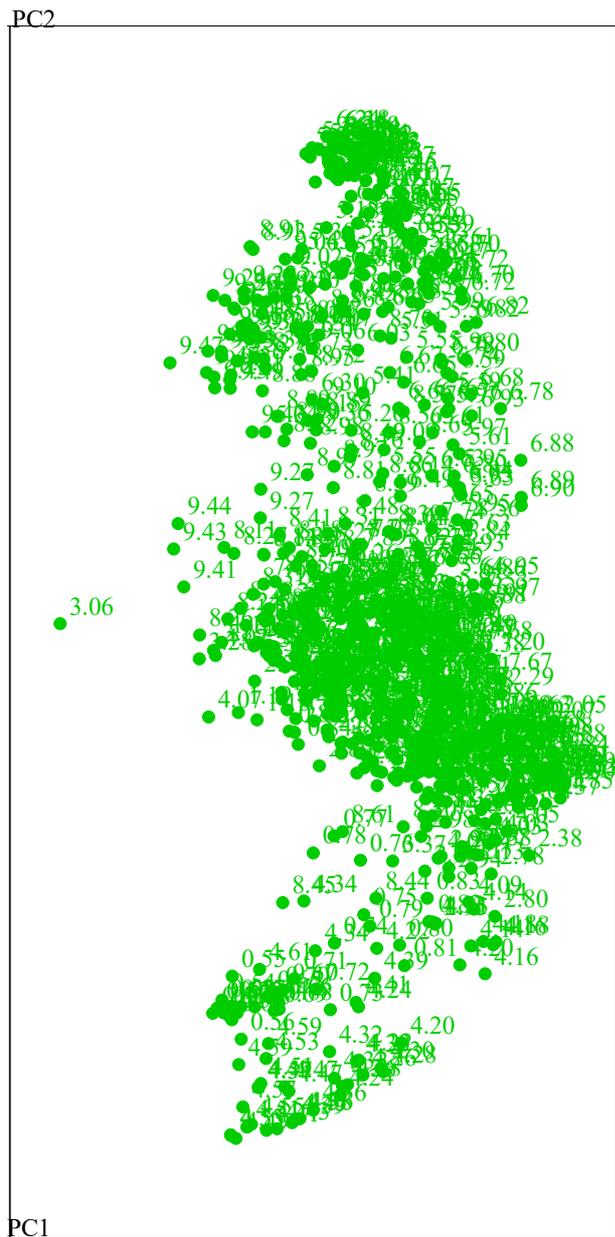


Abbildung 13: Loadingsdiagramm, jedem grünen Punkt ist ein Bucket mit dem jeweiligen ppm Bereich zugeordnet.

## 4. Diskussion

### a. Zeitfenster für Entstehung der Proteinurie

Wir haben unter Patienten mit Diabetes, aber ohne Proteinurie vier Jahre Abstand zum Ausgangspunkt gewählt, um die Entstehung einer Proteinurie zu überprüfen.

Die diabetische Nephropathie kann bei Patienten mit langjährig schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (d. h. dauerhaft zu hohe Blutzuckerwerte) auftreten, unabhängig von der Ursache der diabetischen Stoffwechselstörung. Zehn Jahre nach Erkrankungsbeginn ist bei 25% aller Diabetiker eine Mikroalbuminurie nachweisbar, bei 5% eine Proteinurie, 0,8% weisen eine Nierenfunktionseinschränkung auf. Wird die Nierenfunktionseinschränkung nicht behandelt, schreitet diese im Allgemeinen schnell fort.

Das dialysepflichtige Endstadium ist im Median innerhalb von 25 Jahren erreicht.(38) Allerdings kann die Erkrankung auch schnell progredient sein und, falls sie nicht behandelt wird, innerhalb von zwei bis drei Jahren nach dem Auftreten der ersten Veränderungen zum vollständigen Verlust der Nierenfunktion führen.(39) Die Wahl des 4-Jahresintervalls bildet hierbei einen guten Kompromiss, wobei die tatsächliche Dauer des Diabetes mellitus im Datensatz der GCKD-Studie nicht verfügbar war und in der Regel wohl deutlich länger war.

## **b. Besteht Bedarf für weitere diagnostische Marker?**

Derzeit sind keine zuverlässigen prognostischen Marker für das Auftreten einer späteren Proteinurie im Rahmen einer diabetischen Nephropathie bekannt.

Gründe sind, dass eine lineare Proportionalität zwischen dem Schweregrad der mikropathologischen Veränderungen und dem Grad der Niereninsuffizienz nicht beschrieben wurden. Nicht alle Diabetiker entwickeln eine diabetische Nephropathie. Familienuntersuchungen zeigen einen starken Einfluss der Erbanlagen (genetische Prädisposition).(40) Ebenso gibt es keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem durchschnittlichen Blutzuckerspiegel (HbA1c) und dem Stadium der Niereninsuffizienz.(41) Damit sind klassische Parameter des Diabetes mellitus keine guten Prognosemarker. Derzeit gilt: Patienten mit Diabetes mellitus sollten jährlich auf das Vorhandensein einer diabetischen Nephropathie untersucht werden. Bei Typ-1-Diabetikern ist in der Regel ab dem fünften bis zehnten Jahr der Erkrankung mit einer beginnenden Nierenbeteiligung zu rechnen. Typ-2-Diabetiker sollte ab der Diagnosestellung regelmäßig auf Mikroalbuminurie getestet werden, da sie oft Jahre nach Beginn der Erkrankung diagnostiziert werden.(42)

Im Rahmen der Früherkennungsuntersuchung werden der Albumin/Kreatinin-Quotient ACR im ersten Morgenurin und das Kreatinin im Serum bestimmt. Aus dem Serum-Kreatinin wird mit Hilfe einer Näherungsformel die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Maß der Nierenfunktion geschätzt. Wird in 2 von 3 Urinproben eine Mikro- oder Makroalbuminurie festgestellt, liegt eine chronische Nierenschädigung vor. Dieser Ansatz erfasst also erst eine bereits bestehende Proteinurie/Nephropathie. Das betont den Stellenwert unserer und weiterer Studien, frühe Prognosemarker zu etablieren.(14)

### **c. Ausblick auf weitere Marker in der Literatur**

In Bezug auf Früherkennung und Vorhersage zur Progression der DN werden jene Moleküle, die eine Rolle bei Entzündungen, Fibrose, endothelialer Dysfunktion und tubulärer Schädigung spielen, am häufigsten untersucht. Daher werden zahlreiche Biomarkerkandidaten, die nachweislich eine Beteiligung an der Pathogenese der DN haben, auf der Grundlage von in vitro- und in vivo-Studien vorgeschlagen.(43),(44)

Alle nachfolgend aufgeführten Studien teilen keine Analyten mit unserer Studie. Alle diese Studien sind jedoch als Pilotstudien zu bewerten, darauf aufbauende Nachfolgestudien, insbesondere prospektiv, im klinischen Setting liegen nicht vor.

Hanna Kwiendacz et al listeten in ihrem Übersichtsartikel (Tabelle 10) vielversprechende prognostische Biomarker (im Serum oder Urin) auf:(43)

BIOMARKER	Pathophysiologische Rolle	Assoziation mit DN
Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 (TNFR1)	Einer der Hauptrezeptoren für Tumornekrosefaktor $\alpha$ ; kann den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren, vermittelt Apoptose und fungiert als Entzündungsregulator	Erhöhte TNFR1-Konzentration im Serum ist mit erhöhtem ESRD-Risiko bei Typ-2-Diabetes verbunden
Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ2 (TNFR2)	Zusammen mit TNFR1 bildet sich ein Komplex, der die Rekrutierung von Anti-Apoptose-Proteinen (c-IAP1 und c-IAP2) vermittelt	Erhöhte TNFR2-Konzentration im Serum ist mit erhöhtem Risiko einer Nierenerkrankung im Endstadium bei Typ-2-Diabetes verbunden
Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (FGF21)	Stimuliert die Glukoseaufnahme in Adipozyten (additiver Effekt zu Insulinaktivität)	Die Serum-FGF-21-Konzentration ist mit UACR bei Typ-2-Diabetes Patienten assoziiert
B-Typ Natriuretisches Peptid (NT-proBN)	Biomarker für Myokardschäden, der zur Diagnose und Prognose von akuter kongestiver Herzinsuffizienz verwendet wird	Ist mit der Progression der Nierenerkrankungen assoziiert
Copeptin	Stabiles Fragment des Prä-Pro-Vasopressins und ein hämodynamischer Stress-Biomarker	Die Copeptin-Konzentration ist mit einer Abnahme der
Kidney injury molecule-1 (KIM-1)	Marker für aktive/andauernde tubuläre Schäden (jedoch nicht für tubuläre Narbenbildung)	Eine erhöhte KIM-1 Konzentration ist mit einem schnelleren Rückgang der eGFR
Das neutrophilengelatine-assozierte Lipocalin (NGAL)	Wird als Reaktion auf eine tubuläre Verletzung produziert und ist daher für eine funktionierende tubuläre Masse repräsentativ	Eine erhöhte NGAL Konzentration ist mit einem schnelleren Rückgang der eGFR
Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)	Tubulus-spezifisches Protein, das Gewebereaktion auf Verletzungen in den Nieren mit tubulointerstitieller Schädigung moduliert	Eine verringerte Konzentration im Urin ist mit einem erhöhten Risiko einer frühen Progression der DN verbunden
Klotho (Protein)	Ursprünglich als Anti-Aging-Protein definiert; Co-Rezeptor von FGF23 und wird hauptsächlich von den Nierentubuli	Eine verringerte Konzentration ist mit einem Risiko
Knochenmorphogenetisches Protein 7 (BMP7)	natürlicher Antagonist von TGF- $\beta$ 1 mit antifibrotischen und entzündungshemmenden Eigenschaften	Eine verringerte Konzentration ist mit einem höheren Risiko für die Entwicklung und das Fortschreiten

NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells); ESRD (End Stage Renal Disease, terminales Nierenversagen); c-IAP1 und c-IAP2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 and 2, zellulärer Inhibitor des Apoptoseproteins-1 und 2); TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor beta, Transformierender Wachstumsfaktor Beta)

Tabelle 10: Neue Biomarker der (diabetischen) Nephropathie und deren wesentliche Charakteristika. Quelle: Kwiendacz H, Nabrdalik K, Stompór T, Gumprecht J. What do we know about biomarkers in diabetic kidney disease? *Endokrynol Pol.* 2020;71(6):545–50.

## i. Biomarker im Blutplasma

Die 2020 veröffentlichte Studie „FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy“ untersuchte Plasmaproben von 268 Typ 2 Diabetikern und schlussfolgerte aus den Ergebnissen, dass FABP1 und FABP2 (fatty acid-binding protein 1 and 2) mögliche Biomarker darstellten. Das Fettsäure-bindende Protein 1 (FABP1) wird in proximalen Tubuluszellen der Niere als Reaktion auf Hypoxie, die durch einen verringerten peritubulären Kapillarblutfluss verursacht wird, exprimiert. FABP2 ist für den Transport freier Fettsäuren in die intestinalen Endothelzellen verantwortlich. CKD-Patienten haben eine Proteinurie- und Fettsäureüberladung in den proximalen Tubuli und die Hypertriglyceridämie akzeleriert zusätzlich die Fettsäureüberladung, was einen erhöhten Spiegel erklären könnte. Die Werte steigen also nur als Reaktion auf den pathologischen Prozess an und spielen keine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Erkrankung. Die FABP1- und FABP2-Plasmaspiegel, die mit antikörperbasiertem Nachweisverfahren (Enzyme-linked

Immunosorbent Assay ELISA) gemessen wurden, stiegen parallel mit Fortschreiten der diabetischen Nephropathie an. (45)

In der groß angelegten Studie von 2019 „Serum Metabolomic Alterations Associated with Proteinuria in CKD“ wurden mittels der Massenspektrometrie eine ungezielte Analyse von 637 Metaboliten im Serum durchgeführt. Davon wurden 58 Metaboliten mit Proteinurie assoziiert, wobei 4-Hydroxychlorthalonil und 1,5-Anhydroglucitol die niedrigsten p-Werte hatten. Allerdings wurden in dieser Studie nicht ausschließlich Diabetiker, sondern allgemein Patienten mit einer CKD (aus den klinischen Studiengruppen: „African American Study of Kidney Disease and Hypertension“ n=962 und „Modification of Diet in Renal Disease study“ n=602) untersucht.(46)

In einer finnischen Studie von 2018 „Metabolomic profile predicts development of microalbuminuria in individuals with type 1 diabetes“ wurden Blutseren von 200 Patienten mit Typ 1 Diabetes (Gruppe 1, n=102: entwickelten nach 3,2 Jahren Mikroalbuminurie; Gruppe 2, n=98: blieben normoalbuminurisch nach 7,1 Jahren) miteinander verglichen und die metabolomischen Unterschiede herausgearbeitet. Es wurden insgesamt 111 signifikante Metaboliten gefunden, wobei die 30 wichtigsten aufgelistet und Stoffe wie Erythrit(ol), Sorbit(ol), N-trimethyl-5-Aminovolerat,  $\gamma$ -Glutamylglutamat und  $\alpha$ -Hydrocaprocat namentlich hervorgehoben wurden.(47)

In dem Artikel „Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review“ von 2012 wurden 15 Studien systematisch rezensiert und die Validität der vorgestellten Biomarker, die den Beginn oder das Fortschreiten einer Nephropathie bei Patienten mit Typ-2-Diabetes vorhersagen, überprüft. Lediglich sechs Studien hatten eine ausreichende methodische Qualität und stellen 13 signifikante Biomarker vor: Serum-Interleukin 18, Asymmetrisches Dimethylarginin ADMA (in Plasma); (im Urin:) Ceruloplasmin Immunglobulin G und Transferrin wurden als prognostische Marker für den Beginn einer Nephropathie vorgeschlagen. Asymmetrisches Dimethylarginin, Zelladhäsionsmolekül 1 (vascular cell adhesion molecule 1), interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1(intercellular cell adhesion molecule 1), Interleukin 6 und von-Willebrand-Faktor wurden als Marker angesehen, die eine Progression der bestehenden Nephropathie vorhersagen. Zu den Markern, die beides (Beginn und das Fortschreiten einer Nephropathie) vorhersagen können, zählen:

Hochempfindliches C-reaktives Protein (high-sensitivity C-reactive Protein, hs-CRP), E-Selektin, gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator, t-PA), von-Willebrand-Faktor und Triglyceride.(48)

## ii. Biomarker im Urin

Die Studie „Early detection by urinary proteome analysis: A new concept in patient management of diabetic nephropathy“ von 2020 bestätigte, dass CKD 273, ein Multimarker aus 273 Proteinfragmenten, sich gut für die Früherkennung einer diabetischen Nephropathie eignet. Jene Peptide und Proteine (aus der Urin Proteomanalyse) sind an der Pathophysiologie (der DN) beteiligt und zeigen erhebliche Vorteile bei der Diagnose bzw. Prognose im Vergleich zu dem Marker Albuminurie.(49) Die CKD 273 Methode wurde bereits 2013 in einer Studie vorgestellt, wobei sie für die Klassifizierung und Vorhersage zur Progression der allgemeinen CKD eingesetzt wurde.(50)

Eine Studie von 2010 „Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)“ (n=269) besagt, dass durchaus gute Vorhersagen für eine zukünftige diabetische Nephropathie bei Typ-1-Diabetikern durch das Messen von der Albumin Ausscheidungsrate zusammen mit dem N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase-Spiegel im Urin getroffen werden können.(51)

Ein Jahr später wurde eine Studie „Advanced glycation urinary protein-bound biomarkers and severity of diabetic nephropathy in man“ (n=284) veröffentlicht, bei der veränderte Proteine bei Typ-1- und Typ-2-Diabetikern im Urin untersucht wurden. Es stellte sich heraus, dass durch Glykationsendprodukte AGEs (advanced glycation end products) modifizierte Proteine bei der Urinausscheidung nützliche Biomarker für Albuminurie darstellen.(52)

Glykationsendprodukte (AGEs) vermitteln progressive Gewebeschädigung bei diabetischer Nephropathie, weshalb sie als Biomarker in Frage kommen. Daher wurde in der Studie von 2011 „Temporal increases in urinary carboxymethyllysine correlate with albuminuria development in diabetes“ die Akkumulation des AGE

Carboxymethyllysin (CML) im Urin in diabetischen Ratten untersucht. Die Ausscheidung von CML im Urin war erhöht, bevor Albumin im Urin nachweisbar war.(53)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in der Literatur zahlreiche neue Ansätze finden lassen und viele Vorschläge zu neuen Biomarkern gemacht werden. Es lassen sich auch einige unabhängige Validierungsstudien zu den gefundenen Biomarkern finden. Beispielsweise zur CKD273-Methode, die seit 2013 erfolgreich getestet und mehrfach verwendet wurde. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Studien publiziert, die die Ergebnisse von Ángel Argilés et al bestätigen konnten. Die Autoren Critselis et al 2015, Pontillo et al 2016 und Zürlig et al 2019 kamen in ihren Studien zu den gleichen Ergebnissen.(54),(55),(56)

Auch die Studie über FABP1 und FABP2 Marker von I-Ting Tasi et al verifiziert die Ergebnisse vorausgegangener Studien. Panduru et al konnte in der Studie 2013 nachweisen, dass FABP1 (auch L-FABP, liver type fatty acid binding protein genannt) einen zuverlässigen Vorhersageparameter für die Progression der DN (bei Patienten mit Typ 1 Diabetes) in allen Stadien darstellt.(57) Ryo Sato et al berichten 2014 über klinische Verwendung der FABP1-Messung in Japan. Die Konzentration wird im Urin gemessen und dient als Biomarker für akute Nierenschäden bei Patienten in Intensivpflege.(58)

#### **d. Der klinische Nutzen einer Früherkennung**

Der klinische Nutzen einer Früherkennung steht außer Frage: Jährlich entwickeln allein in Deutschland ca. 16 000 Menschen terminales Nierenversagen, darunter 36-49% Diabetiker.(7) 10 Jahre nach der Erstdiagnose von Diabetes, weisen 24,9% der Patienten eine Mikroalbuminurie und 5,3% eine Makroalbuminurie vor.(38) Wird allerdings im Rahmen einer Früherkennung das Risiko einer Proteinurie erkannt, so können zahlreiche Behandlungsmaßnahmen zur Prävention rechtzeitig und intensiviert gestartet werden:

An erster Stelle steht die strikte Blutzuckerregulierung mit Antidiabetika und Ernährungs-/Lebensstilumstellung (Nikotinkarenz, vermehrte körperliche Aktivität), der HbA1c-Wert sollte unterhalb 6,5-7% liegen. Weiterhin wird empfohlen, dass die Behandlung mit einer Blutdruck-, sowie Lipidstoffwechsel-Kontrolle (Stoffwechsoptimierung) kombiniert wird.(7) Das erste Mittel der Wahl zur Blutdrucksenkung (unter 130/80 mmHg) sind AT1-Rezeptorblocker oder ACE-Hemmer, die Angiotensin-II-vermittelten Effekte hemmen. Das führt zu einer Stabilisierung der glomerulären Filtrationsbarriere, einer Abschwächung proinflammatorischer und profibrotischer Schädigungsmechanismen und letztendlich zu der gewünschten Reduktion des glomerulären Filtrationsdrucks.(59) Zusätzlich/Sekundär werden Kalzium-Antagonisten und Diuretika aufgrund der verstärkten Wirkung auf kardiovaskuläre und renale Endpunkte verabreicht.(60) Für Cholesterinspiegel- bzw. Lipidsenkung werden Statine empfohlen. Und die Einnahme von niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (ASS) fungiert zusätzlich als Vorbeugung gegen Herz-Kreislauf-Komplikationen. Nachweislich wird so die Progression der Nephropathie, Retinopathie und makrovaskuläre Komplikationen verlangsamt. (7)

Liegt bereits eine Mikroalbuminurie bei einem Typ-2-Diabetiker vor, kann mit der Gabe von ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptorblocker, insbesondere wenn eine Hypertonie vorliegt, der Anstieg der Albuminausscheidung aufgehalten, respektive umgekehrt werden. Selbst bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz konnte eine deutliche, wenngleich geringere Progressionshemmung (von 33%) verzeichnet werden.(7)

Wünschenswert wäre dann im nächsten Schritt eine Interventionsstudie, die ein verbessertes Outcome solcher Maßnahmen unter den früherkannten Risikopatienten klinisch prüft. Hierzu lassen sich in der Literatur keine validen Studien finden.

#### **e. Signifikante Metaboliten**

Wir konzipierten eine Pilotstudie mit dem Ziel aussichtreiche Biomarker für weitere Studienansätze zu identifizieren. Daher war das Verfahren der NMR-Spektroskopie gut geeignet, da sehr viele Metaboliten auf einmal gemessen werden können. Aufgrund der multiplen Variablen war jedoch das Erreichen von Signifikanzen nach der Korrektur für multiples Testen in der bestehenden Studiengröße nicht möglich.

Und es gilt daher auch Trends zu beobachten, die kein Signifikanzniveau erreichen. Folgende Stoffe waren auffällig im Blut: Kreatinin, Phenylalanine und im Urin: N-Methylhydantoin, Dimethylamin und sollen jetzt nachfolgend im Einzelnen beleuchtet werden:

**i. identifizierte Marker im Blutserum**

**4. Kreatinin(C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O)**

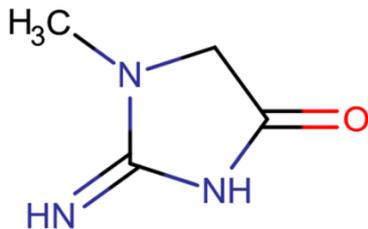


Abbildung 14: Valenzstrichformel Kreatinin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database)

Die errechneten Mittelwerte von Serumkreatinin waren mit 66 µmol/l in der Gruppe MIT höher als in der Gruppe OHNE mit 61 µmol/l (Tabelle 5). Kreatinin zählt als Abbauprodukt (Lactam des Kreatins) aus Muskelgewebe. Der Anfall im Blut hängt damit von etlichen Einflussfaktoren ab: Geschlecht, Lebensalter, körperliche Aktivität und Muskelmasse. Ein höherer Anfall in der Gruppe MIT erschließt sich daraus nicht unmittelbar, insbesondere Alter und Geschlecht waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Als harnpflichtige Substanz wird Kreatinin über glomeruläre Filtration und partiell tubulär ausgeschieden. Es wäre damit vorstellbar, dass Kreatinin bereits in präklinischen Stadien einer Niereninsuffizienz/Proteinurie durch filigrane Veränderungen etwas vermindert ausgeschieden wird.

Als Einzelwert kann Kreatinin in der herkömmlichen klinischen Chemie im Blutplasma, bzw. Serumkreatinin zur groben Abschätzung der Nierenfunktion bestimmt werden, wobei dies in der Praxis einige Einschränkungen aufweist. Grund dafür ist, dass Serumkreatinin beispielsweise von Muskelmasse und -aktivität stark beeinflusst wird. Die Nierenfunktion wird daher mit der Abschätzung der GFR beurteilt.

Die GFR gibt an, wie viel Volumen pro Zeiteinheit von den Glomeruli der Nieren filtriert wird. Hierzu gibt es verschiedene Formeln:

Die MDRD-4 Formel (Modification of diet in renal disease Studie) mit 4 Variablen:

$GFR \text{ (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 186 \times (\text{Serumkreatinin mg/dl})^{-1,154} \times (\text{Alter in Jahren})^{-0,203} \times$   
(0,742 bei Frauen)

Die MDRD-6 Formel mit 6 Variablen enthält zusätzlich Serum-Harnstoff und Serum-Albumin Werte, wobei keine genaueren Ergebnisse im Vergleich zur MDRD-4 Formel herauskommen.(61)

Die CKD-EPI Formel (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), die laut Jeong T.-D. et al genauer ist: (62)

- Frauen mit Serumkreatininlevel  $\leq 0,7$  mg/dL:  $GFR = 144 \times (\text{Serumkreatinin}/0,7)^{-0,329} \times (0,993)^{\text{Alter}}$  bzw.  $>0,7$  mg/dL:  $GFR = 144 \times (\text{Serumkreatinin}/0,7)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{Alter}}$
- Männer mit Serumkreatininlevel  $\leq 0,9$  mg/dL:  $GFR = 141 \times (\text{Serumkreatinin}/0,9)^{-0,411} \times (0,993)^{\text{Alter}}$  bzw.  $>0,9$  mg/dL:  $GFR = 141 \times (\text{Serumkreatinin}/0,9)^{-1,209} \times (0,993)^{\text{Alter}}$

Die Normwerte für Kreatinin liegen in herkömmlicher Blutanalyse laut der HMDB-Datenbank (Human Metabolome Database) bei  $82,6 \pm 26,2 \mu\text{M}$ . Unsere Werte beider Gruppen liegen also innerhalb dieser Norm. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eventuell schon in einem frühen, präklinischen Stadium feine Unterschiede, bzw. ein geringer Kreatininanstieg bestehen. Der geringe absolute Unterschied in unserer Studie macht es für den klinischen Gebrauch eher impraktikabel, diese Bestimmungen als prognostisches Verfahren für eine spätere Proteinurie einzusetzen. Hierfür wären zumindest größere Studien notwendig, um den Stellenwert zu etablieren.

In einer Retrospektive Kohortenstudie von Serena Low et al wurde bereits der Vorhersagewert von Kreatinin-Schwankungen im Plasma bei Typ-2-Diabetikern untersucht. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass bei Patienten mit Normoalbuminurie eine höhere Kreatinin-Variabilität den Beginn einer Albuminurie prognostizieren könnte.(63)

## 5. Phenylalanin (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>)

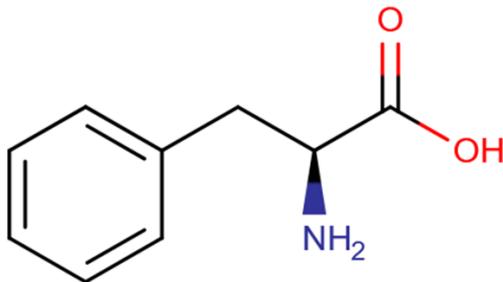


Abbildung 15: Valenzstrichformel Phenylalanin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database)

Die Aminosäure L-Phenylalanin (im weiteren Verlauf Phenylalanin) war in der Patientengruppe MIT niedriger im Plasma als in der Gruppe OHNE gemessen worden (37 µmol/l vs. 40 µmol/l) (Tabelle 5). Phenylalanin ist Bestandteil von vielen Proteinen und muss als essentielle Aminosäure ausreichend mit der Nahrung aufgenommen werden (5-8 g/Tag). Hinweise auf verschiedene Nahrungsaufnahme zwischen unseren Patientengruppen bestanden nicht.

Als kleinmolekulare Substanz (Molare Masse: 165 g/mol) wird Phenylalanin vollständig glomerulär filtriert und tubulär weitgehend reabsorbiert. Ein Verlust und niedrigerer Spiegel wäre also durch eine Störung der tubulären Mechanismen denkbar. Es ist spekulativ, ob der erniedrigte Spiegel durch den Pathomechanismus in der Niere verursacht wird und vor einer späteren Proteinurie messbar ist.

Die Normwerte im Blutplasma bei Erwachsenen, bestimmt durch übliche klinische Chemie, betragen laut HMDB-Datenbank etwa 78,1 +/- 20,5 µmol/L. Damit lagen unsere Werte in beiden Gruppen unter dieser Norm. Dies könnte obige Hypothese unterstützen. Anzumerken ist noch, dass Tyrosin, ebenfalls in unserer Studie bestimmt, als Vorläuferaminosäure Phenylalanin benötigt. Passend lag auch diese Konzentration in der Gruppe MIT niedriger als in der Gruppe OHNE, wenngleich nicht signifikant.

Generell sind Aminosäuren nicht nur Strukturbausteine von Proteinen, sondern auch aktive Signalmoleküle, die den Stoffwechsel regulieren. Aus früheren Studien geht hervor, dass aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) das Potenzial haben, als Marker bei der Diagnose von Typ 2 Diabetikern zu fungieren, da deren Serumspiegel signifikant mit der Insulinresistenz korreliert.(64)

Im Rahmen unserer Studie haben wir auch die Spiegel anderer essentieller Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Threonin, Valin) bestimmt. Für alle lagen die ermittelten Konzentrationen in der Gruppe MIT niedriger als in der Gruppe OHNE, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Alle Werte entsprachen jedoch den bekannten Normwerten in serologischer Bestimmung mit nur geringfügigen Abweichungen (Tabelle 11).

Der Aminosäuren-Plasmaspiegel wird von der Niere, durch biochemische Prozesse (Synthese, Abbau, Umwandlung und tubuläre Reabsorption) reguliert. Daher werden Veränderungen im Abbau, in Synthese und Ausscheidung von aromatischen Aminosäuren AAA (aromatic aminoacid) mit chronischem Nierenversagen assoziiert.(64) Beispielsweise induziert die metabolische Azidose, ein zugehöriger Pathomechanismus der Erkrankung, den Proteinabbau durch Aktivierung der verzweigtkettigen  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenase, die für den irreversiblen Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin) verantwortlich ist.(16)

Rückschließend bleibt anzumerken, dass die Konzentration von Phenylalanin und anderen Aminosäuren im Plasma sowohl vom Pathomechanismus des Diabetes, als auch der Nephropathie beeinflusst werden.

In der Literatur ließen sich zwei Arbeiten finden, die im Widerspruch zu unseren Daten, erhöhte Plasmaspiegel essentieller Aminosäuren fanden:

Zhang et al konnten bei chinesischen Patienten mit Diabetes und späterer chronischer Nierenerkrankung (n=132 pro Gruppe) nachweisen, dass erhöhte Thyrosin-Werte mit einem erhöhten Risiko an diabetischer Nephropathie zu erkranken korrelieren. Allerdings handelt es sich hierbei um eine retrospektive Studie, bei der die Kausalität zwischen AAA und DN nicht nachgewiesen ist.

Weiterhin handelt es sich bei der Studiengruppe mit DN um Patienten in einem sehr fortgeschrittenen Stadium, die keinesfalls repräsentativ für die breite Masse DN-Patienten war. Zuletzt wurde die Ernährung der chinesischen Patienten nicht in die Studie mit einbezogen, die sich zweifelsohne von den Essgewohnheiten der westlichen Kultur unterscheidet.(64) Wie zuvor erwähnt, wird durch die Nahrung die Zufuhr von essentiellen Aminosäuren gewährleistet und ist daher als relevanter Faktor zu bewerten.

Wang et al berichten zu erhöhten Konzentrationswerten bei Diabetikern im Vergleich zu nicht- Diabetikern: Die Blutwerte von Diabetikern unterscheiden sich lange vor Ausbruch der Krankheit signifikant im Gehalt der Aminosäuren: Isoleucin, Leucin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin. Bei Isoleucin, Tyrosin und Phenylalanin war der Zusammenhang am deutlichsten, weshalb die Autoren folgern, dass erhöhte Aminosäurespiegel im Plasma zuverlässige Vorhersagen für das Entstehen der diabetischen Erkrankung erlauben können. Hierbei handelt es sich um zwei großangelegte prospektive Kohortenstudien ( $n > 3.000$ ), die über Jahrzehnte dokumentiert wurden. Zusätzlich wurde zur Datenerhebung eine Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Tripel-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer (eine Weiterentwicklung der LC-MS) verwendet. Die Autoren räumten allerdings ein, dass die alternative LC-MS-Technik und Kernspinresonanzspektroskopie eine weniger voreingenommene Weise der Datenmessung darstellt.(65)

Tahia Saleem et al berichten jedoch, dass in ihrer Fall-Kontroll Studie ( $n=90$ ) die Plasmaspiegel von Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin bei der Gruppe der Diabetiker mit Mikro- und Makroalbuminurie im Vergleich zu Diabetiker mit Normoalbuminurie signifikant erniedrigt waren, was die Ergebnisse unserer Studie unterstützt. (Es gab allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mikroalbuminurie- und Makroalbuminurie-Gruppen.)(16)

	Molare Masse (g/mol)	Normalwert Blut (µM)	MIT Mittelwert (µM)	OHNE Mittelwert (µM)
<b>essentielle AS</b>				
Histidin	155	89.0 +/- 11.0	52.2	53.0
Isoleucin	131	84.0 +/- 18.0	59.2	60.4
Penylalanin	165	78.1 +/- 20.5	37.4	39.9
Threonin	119	127.7 +/- 41	96.1	102.2
Valin	117	212.3 +/- 61.3	204.9	209.8
<b>nicht-essentielle AS</b>				
Alanin	89	320 +/- 87	279.4	280.1
Asparagin	132	32.9 +/- 7.6	32.3	32.2
Glutamin	146	492.6 +/- 93.6	343.0	348.8
Glycin	75	329.9 +/- 105.6	153.3	146.6
Prolin	115	198.3 +/- 64.8	198.0	183.8
Tyrosin*	181	54.5 +/- 9.7	41.8	42.7

\*semi-essentiell (wird aus essentieller AS synthetisiert)

Tabelle 11: Essentielle und Nicht-essentielle Aminosäuren, Messwerte der beiden Studiengruppen und Normalwerte.

## ii. Identifizierte Marker im Urin

### 6. N-Methylhydantoin (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

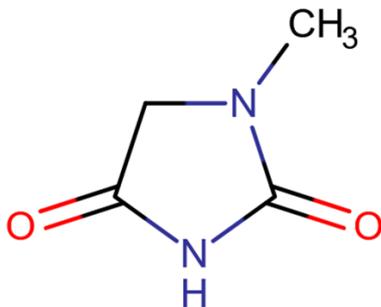


Abbildung 16: Valenzstrichformel N-Methylhydantoin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database)

Der Vergleich der mit AMIX in Buckets ermittelten Urinwerte mittels T-Test aller Patienten MIT vs. OHNE ergab zuerst eine signifikante Abweichung im Bucket von 4,095 ppm mit dem p-Wert: 0,01 (siehe Tabelle 7). Die Mittelwerte der Buckets der Gruppe MIT waren dabei höher als die Mittelwerte der Gruppe OHNE. Nach der Korrektur für multiples Testen erreichte der Wert kein Signifikanzniveau mehr (p-Wert: 0,9981) und kann daher nur als möglicher Trend angesehen werden. In Chenomx wurde diesem Bucket der Referenzbereich von N-Methylhydantoin zugeordnet. Die Art der Berechnung erlaubt keine Aussage über absolute quantitative Unterschiede dieser Substanz zwischen beiden Gruppen, definiert N-Methylhydantoin damit aber als interessanten Metaboliten für weitere Studien.

N-Methylhydantoin ist ein Stoffwechselprodukt von Bakterien und entsteht durch Zersetzung von Kreatinin. Der Stoff kommt im Urin, Blut (als makromolekularer Komplex in zellulärer Substruktur) und Stuhl vor. Die Normalwerte im Urin laut HMDB-Datenbank sind: 4,9 (1,0 – 11,0)  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin. Die ermittelten Konzentrationswerte aus den Urin-Spektren der 10 Patienten aus der GCKD Studie (Tabelle 9) liegen innerhalb des Normbereichs.

Bo Yang et al konnten 2007 mittels fluoreszenzaktivierter Zellanalyse (FACS-Analyse) nachweisen, dass 1-Methylhydantoin Apoptose, sowie mit Nekrose einhergehende Zellveränderungen in proximalen tubulären Zellen in vitro induziert. Die renale intrinsische Apoptose ist ein wichtiges pathologisches Merkmal, die mit einer Progression der Nierenfunktionseinschränkung verbunden ist. Laut der Studie wird 1-Methylhydantoin durch bakterielle Kreatinin-Desaminase im Darmtrakt von Patienten mit Urämie produziert und wieder in den Körper aufgenommen.(66)

Quian Feng et al analysierten 2020 Urin von Patienten mit diabetischer Nephropathie (n=95) mittels Ultra-Performance-Liquid Chromatographie-gekoppeltem Tandemmassenspektrometer (UPLC-MS/MS). Der N-Methylhydantoin-Spiegel der Gruppe DN mit Albuminurie im Vergleich zu der Gruppe mit „nur“ Diabetes Mellitus (simple diabetes mellitus group) war signifikant erniedrigt. N-Methylhydantoin ist einer von vielen Stoffen, der in Verbindung mit dem Prolin-Stoffwechsel steht. Laut Quian Feng et al kann L-Prolin durch Toxine oder Diabetes verursachte Nierenschäden reduzieren, indem es oxidativen Stress abbaut. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass die Metaboliten, die mit dem Prolinstoffwechsel in Verbindung stehen, in Korrelation zur Nierenfunktion stehen.(67)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur vorgestellten Ergebnisse in keinem Widerspruch zu unserer Studie stehen und Methylhydantoin als möglicher Marker in Betracht gezogen werden kann, jedoch bedarf es weitere Nachforschungen.

## 7. Dimethylamin DMA (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>N)

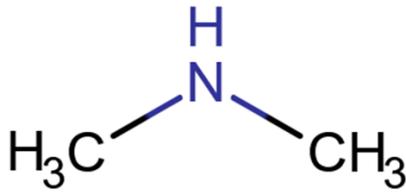


Abbildung 17: Valenzstrichformel Dimethylamin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database)

Der Vergleich der mit AMIX in Buckets ermittelten Urinwerte mittels T-Test aller Patienten MIT vs. OHNE ergab zuerst eine signifikante Abweichung bei 2,725 ppm mit dem p-Wert: 0,02 (siehe Tabelle 7). Die Mittelwerte der Buckets der Gruppe MIT waren höher als die Mittelwerte der Gruppe OHNE. Nach der Korrektur für multiples Testen erreichte der Wert kein Signifikanzniveau mehr (p-Wert: 0,9981) und kann daher nur als möglicher Trend angesehen werden. In Chenomx wurde diesem Bucket der Referenzbereich von Dimethylamin zugeordnet. Die Art der Berechnung erlaubt keine Aussage über absolute quantitative Unterschiede dieser Substanz zwischen beiden Gruppen, definiert Dimethylamin damit aber als interessanten Metaboliten für weitere Studien.

DMA ist das am häufigsten vorkommende niedermolekulare aliphatische Amin im Urin, sowie anderen Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma und Magensaft. Es gibt drei unterschiedliche DMA-Quellen: Ernährung, bakterielle Synthese und endogene Synthese (68) DMA im Urin wird aus Trimethylamin-N-oxid, eine häufige Nahrungskomponente (in Meerestieren), und asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) gebildet.(69) Die Normalwerte im Urin sind laut HMDB-Datenbank ca. 25,2 +/- 1,2 µmol/mmol Kreatinin, wobei nach Verzehr von Fisch und Meerfrüchten die Konzentration deutlich ansteigen kann.(70) Die ermittelten Konzentrationswerte aus den Urin-Spektren der 10 Patienten aus der GCKD Studie (Tabelle 9) liegen innerhalb des Normbereichs.

Im menschlichen Organismus wird der größte Teil von DMA (94%) über die Nieren und etwa 1 – 3% über Stuhl und Ausatemluft ausgeschieden. Etwa 5% des DMA wird über Demethylierung in Methylamin umgewandelt.(71)

Es wurden lediglich erhöhte Werte im Blut mit Erkrankungen der Niere in Verbindung gebracht. Tom Teerlink et al schlussfolgerten, dass diese hohen Werte (mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gemessen) zum einen durch die eingeschränkte Ausscheidung über die Nieren, zum anderen durch eine erhöhte bakterielle Synthese im Darm zustande kommen. (Die Anzahl der entsprechenden Bakterienkolonien im Dünndarm der Patienten mit chronischem Nierenversagen ist höher.)(68) Simenhoff M. et al konnten nachweisen, dass die Behandlung mit Antibiotika bei urämischen Patienten eine deutlich reduzierte DMA-Konzentration im Serum nach sich zieht.(72)

Weiterhin konnten erhöhte DMA-Werte im Blut von Patienten mit Urämie nachgewiesen werden.(73) Angaben zu erhöhten/erniedrigten Dimethylamin-Werten im Urin im Zusammenhang mit DN gab es nicht. Daher bleibt es fraglich, ob DMA als Marker im Urin in Frage kommt.

## **f. Limitationen**

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht es die Konzentrationen von Metaboliten in Bioflüssigkeiten zu ermitteln. Allerdings kommt das Verfahren der NMR-Spektroskopie jedoch an seine Grenzen, wenn mehrere Metaboliten aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft Signale auf derselben Stelle in der Frequenzachse aufweisen. Es kommt zu einer Überlagerung der Signale und es formt sich, wie im Ergebnisteil der Promotion näher erläutert, eine Summenlinie im Spektrum. Eine eindeutige Identifizierung von Metaboliten ist demnach in einigen Fällen kaum möglich.

Es wurden im Rahmen der Studie einige interessante Metabolite identifiziert. Allerdings waren die beobachteten Unterschiede klein und in allen Fällen nach der Korrektur für multiples Testen nicht mehr signifikant.

Weiterhin wären weitaus größere Patientengruppen nötig, um bei geringen Unterschieden signifikante Aussagen über Marker treffen zu können. Unsere Patientenzahl war durch die Gesamtpopulation der GCKD-Studie limitiert, alle verfügbaren Patienten gemäß den Einschlusskriterien für die Proteinuriegruppe wurden rekrutiert und die Größe der Vergleichsgruppe angepasst.

In einer Anschluss-Studie könnten nun gezielt die identifizierten Marker mit Tendenz/Signifikanz analysiert werden, bei wenigen Variablen dann entsprechend eine überschaubare Patientenzahl rekrutiert werden.

Diabetische Nephropathie ist darüber hinaus eine Erkrankung, die von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird und ein komplexes System an Wechselwirkungen untereinander den Verlauf bestimmen. All diese Faktoren können nur bedingt in einer Studie berücksichtigt werden. Beispielsweise haben wir Parameter der Blutzuckererkrankung (Schwankungen, Dauer, Typ 1/2, Qualität der Einstellung und Medikation), andere vaskuläre Risikofaktoren (Rauchen, Bluthochdruck) und genetische Faktoren nicht erfasst. Potentielle Störfaktoren können also bestehen, die zu falsch positiven Ergebnissen oder Verlust von Signifikanzen geführt haben.

#### **g. NMR-Spektroskopie als klinisches Untersuchungsverfahren**

Wir haben in unserer Studie kein klassisches klinisch-chemisches Untersuchungsverfahren eingesetzt, sondern die NMR-Spektroskopie verwendet. Dies hat den Vorteil, in einem Messdurchgang ein breites Spektrum an Metaboliten zu erfassen. Der erforderliche technische Aufbau limitieren das Verfahren allerdings. Als Standard für zukünftige klinische Anwendungen ist die NMR-Spektroskopie daher kaum geeignet. Vielmehr können für gefundene aussagekräftige Analyten im klinischen Alltag später andere, kosteneffektive und breit verfügbare Verfahren, etabliert werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die diabetische Nephropathie ist eine schwerwiegende Komplikation des Diabetes, die durch Veränderungen in Struktur und Funktion der Nieren verursacht wird und zu einer drastisch erhöhten Morbidität und Mortalität führt. Ungefähr ein Drittel aller Typ 1 und Typ 2 Diabetiker erkranken wiederum an diabetischer Nephropathie. Dies betont die Wichtigkeit diagnostischer Biomarker für die Früherkennung der DN.

Daher war das Ziel meiner Promotionsarbeit mögliche Biomarker für Proteinurie im Plasma und Urin mittels NMR-Spektroskopie zu identifizieren.

Die dafür verwendeten Biomaterialien der 223 ausgewählten Patienten stammen aus dem Pool der GCKD-Studie. Es wurden zwei Gruppen gebildet (Gruppe MIT: Patienten weisen nach 4 Jahren eine Proteinurie auf; Gruppe OHNE: Patienten weisen keine Proteinurie nach 4 Jahren auf) und statistisch miteinander verglichen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Plasma-Spektren zum (Baselinezeitpunkt 0) auf 25 im Blut vorkommende Metaboliten mit Hilfe der Software Chenomx quantifiziert. Für jeden Metaboliten wurden die Konzentrationswerte (Mittelwerte, Standardabweichungen, relative Standardabweichungen) und p-Werte ermittelt. Die Konzentrationen von Kreatinin lag in der Gruppe MIT signifikant höher, von Phenylalanin signifikant niedriger als in der Gruppe OHNE ( $p=0,027$  respektive  $0,018$ ), die allerdings nach der Korrektur für multiples Testen nach der Methode von Benjamini und Hochberg kein Signifikanzniveau mehr erreichten (Kreatinin:  $0,26$ ; Phenylalanin:  $0,26$ ). Damit sind diese Metaboliten als Trends für mögliche Biomarker zu werten. In der Literatur lassen sich zu den zwei genannten Stoffen Studien finden, allerdings nicht immer in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Urin-Spektren zum (Baselinezeitpunkt 0) im Sinne einer Screeningstudie mit der Software AMIX analysiert. Hierbei wurde auf die aufwändige manuelle Analyse einzelner bekannter Metaboliten mittels der Software Chenomx verzichtet und stattdessen unspezifisch im gesamten erfassten Spektrum nach signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen im Bucketingverfahren gesucht. 12 von 900 Buckets wurden nach dem durchgeführten T-Test als signifikant abweichend angesehen, erreichten jedoch nach der Korrektur für multiples Testen ( $p\text{-Wert}=0,9981$  für alle Buckets) kein Signifikanzniveau mehr. Potenzielle mit diesen Spektralbereichen korrelierende Metaboliten (Analyse mit Chenomx) waren Methylhydantoin und Dimethylamin. In der Literatur ließen sich Studienergebnisse zu den beiden zuvor genannten Stoffen finden, die mit einer DN, bzw. Nephropathie (im Allgemeinen) in Verbindung gebracht wurden.

Abschließend lässt sich bemerken, dass in unserer Studie lediglich Trends zu beobachten waren, die jedoch interessante Marker für größer angelegte prospektive Studien aufzeigen, um deren Stellenwert genau zu etablieren.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AAA	aromatische Aminosäuren (aromatic aminoacid)
AASK	African American Study of Kidney Disease
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACR	Albumin-Kreatinin-Quotient
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGEs	Advanced Glycation End Products
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
CKD	Chronic Kidney Disease
CML	Carboxymethyllysin
CSI	Chemical Shape Indicator
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DMA	Dimethylamin
DN	Diabetische Nephropathie
eGFR	Estimated GFR
FABP1/2	Fettsäure-bindendes Protein 1 und 2 (fatty acid-binding protein 1/2)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FID	Free Induction Decay
FT	Fourier Transformation
GLUT-1	Glucose Transporter 1
GCKD	German Chronic Kidney Disease
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HbA1c	HämoglobinA1c
HMDB	Human Metabolome Database
IR-Spektroskopie	Infrarot-Spektroskopie
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
MS	Massen-Spektroskopie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor) beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor) alpha
TSP	Trimethylsilylpropionsäure
UPLC-MS	Ultra-Performance-Liquid Chromatographie-gekoppeltem Tandemmassenspektrometer
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)

## 7. Anhang

### a. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinik und Stadieneinteilung nach Mogensen und KDOQI .....	13
Tabelle 2: Charakteristika GCKD-Studie; Quelle: Titze S, Schmid M, Kottgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. Nephrol Dial Transplant (2015) 30:441-451, doi:10.1093/ndt/gfu294 .....	23
Tabelle 3: 25 Metaboliten und ihre jeweilige Leit-Referenzfrequenz in ppm. Es wird immer die Position des hauptsächlich zur Quantifizierung verwendeten Signals angegeben.....	30
Tabelle 4: Charakteristika der Studiengruppen. ....	34
Tabelle 5: Mittelwert, Standardabweichung, relative Standardabweichung, T-Test der jeweiligen Metaboliten beider Gruppen. ....	35
Tabelle 6: Statistischer Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen unserer 25 Studienmetaboliten der Gruppen MIT und OHNE. Angabe der p-Werte ohne Korrektur für multiples Testen (rawp) und mit (BH). ....	36
Tabelle 7: 12 von 900 mit der Software analysierten Buckets mit enthaltenen Signalen zeigten sich im T-Test signifikant abweichend zwischen den Gruppen MIT und OHNE. ....	37
Tabelle 8: Statistischer Vergleich der Bucket-Mittelwerte der Gruppen MIT und OHNE. Angabe der p-Werte nach Korrektur für multiples Testen. (Urin-Spektren). .	38
Tabelle 9: Konzentrationswerte und Mittelwerte von Dimethylamin und N-Methylhydantoin der Gruppe MIT und OHNE.....	39
Tabelle 10: Neue Biomarker der (diabetischen) Nephropathie und deren wesentliche Charakteristika. Quelle: Kwiendacz H, Nabrdalik K, Stompór T, Gumprecht J. What do we know about biomarkers in diabetic kidney disease? Endokrynol Pol. 2020;71(6):545–50. ....	44
Tabelle 11: Essentielle und Nicht-essentielle Aminosäuren, Messwerte der beiden Studiengruppen und Normalwerte. ....	54

## **b.    Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schema des makroskopischen (links) und mikroskopischen (rechts) Aufbaus der Niere; Quelle: Linkes Bild: Die Urologie (2016) Maurice Stephan Michel Springer Verlag ISBN: 2978-3642399398 ; Rechtes Bild: Gray’s Anatomy (1918) Anatomy of the Human Body, Tafel 1128.....	7
Abbildung 2: Stadieneinteilung (mit GFR und Proteinurie Werten) und Prognose der chronischen Nierenerkrankung; Grün: geringes Risiko (wenn keine anderen Marker einer Nierenerkrankung vorliegen, keine CKD), Gelb: mäßig erhöhtes Risiko, Orange: hohes Risiko, Rot: sehr hohes Risiko; Quelle: Klinische Praxisleitlinie für Bewertung und Behandlung von CKD nach KDIGO von 2012.....	9
Abbildung 3: Diagnoseverteilung. Diagnosen der Patienten bei Therapiebeginn (Bericht Quasi-Niere, 2004 Deutschland); Quelle: Aus Khulmann, U., D. Walb, J.Böhler; Nephrologie (ISBN: 9783137002055) □ 2008 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart .....	10
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Spektrometers. Quelle: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, 4. Auflage Horst Friebolin (2006) Wiley-VCH Verlag, Weinheim ISBN-3-527-31571-3 .....	17
Abbildung 5: Typisches Plasma-NMR-Spektrum aus der GCKD-Studie.....	18
Abbildung 6: FID Signal: Intensität variiert mit der Zeit; Spektrum: Intensität variiert mit der Frequenz. Quelle: AVANCE Beginners Guide, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen.....	20
Abbildung 7: Art und Konzentration der Referenzsubstanz.....	28
Abbildung 8: Kalibrierung der Referenzsubstanz mit Chenomx. ....	29
Abbildung 9: Beispiel Phenylalanin am Pat. 8 Gruppe „MIT“ Proteinurie; Einpassung der Lorentz Kurve in das gemessene 1D 1H Plasma Spektrum. ....	30
Abbildung 10: NMR-Spektren der Patienten 5,6,7 aus der Gruppe „MIT“ überlagert mit AMIX dargestellt. ....	32
Abbildung 11: Auswahl der Studienpatienten.....	33

Abbildung 12: Scorematrix PCA Hauptkomponentenanalyse: Gruppe „MIT“ (Rot) ; Gruppe „OHNE“ (Grün); PC1= Principal component 1; PC“= Principal Component 2. .....	40
Abbildung 13: Loadingsdiagramm, jedem grünen Punkt ist ein Bucket mit dem jeweiligen ppm Bereich zugeordnet.....	41
Abbildung 14: Valenzstrichformel Kreatinin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database) .....	49
Abbildung 15: Valenzstrichformel Phenylalanin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database) .....	51
Abbildung 16: Valenzstrichformel N-Methylhydantoin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database) .....	54
Abbildung 17: Valenzstrichformel Dimethylamin. Quelle: HMDB Datenbank (Human Metabolome Database) .....	56

## 8. Literaturverzeichnis

1. Robert F. Schmidt, Lang Florian, Heckmann Manfred. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31st ed. Springer; 2011.
2. E. Hoberg, J.-C. Galle, Birna Bjarnason-Wehrens, C. Cordes, G. Klein, D. Willemsen, et al. Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen. *Herzmed* 24 Nr3. 2007;136–46.
3. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2022 Apr 15];63(5):713–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272638614004910>
4. Dikow R, Ritz E. Mikroalbuminurie: Frühwarnsystem für den nierenkranken Diabetiker. *Deutsches Ärzteblatt*. 2003 Apr 25;(17):A-1100/B-926/C-870.
5. KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2007 Feb;49(2 Suppl 2):S12-154.
6. Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol*. 2011;170:1–7.
7. Werner Scherbaum, Eberhard Ritz. Prävention und Therapie der diabetischen Nephropathie. *Dtsch Ärztebl* [Internet]. 2005 Jan 21 [cited 2022 Jan 12];102(3). Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/45057/Praevention-und-Therapie-der-diabetischen-Nephropathie>
8. Sahoo MK, Gnudi L. Diabetic Nephropathy: An Overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2020;2067:3–7.
9. Schatz H, Ammon HPT, editors. Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis; 114 Tabellen. 4., erw. und aktual. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006. 405 p.

10. Hakrrouch S, Moeller MJ, Theilig F, Kaissling B, Sijmonsma TP, Jugold M, et al. Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease. *Am J Pathol.* 2009 Nov;175(5):1883–95.
11. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2008 Mar;19(3):433–42.
12. Gnudi L, Thomas SM, Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2007 Aug;18(8):2226–32.
13. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1349–58.
14. Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin (DEGAM), Deutsche Gesellschaft Für Gefäßchirurgie Und Gefäßmedizin (DGG), Deutsche Gesellschaft Für Innere Medizin (DGIM) (Vertreten Durch Die DDG), Deutsche Gesellschaft Für Nephrologie (DGfN), et al. Nationale VersorgungsLeitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung, 1. Auflage [Internet]. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2010 [cited 2021 Dec 6]. Available from: <http://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/diabetes-mellitus/dm-nierenerkrankungen-1aufl-vers6-lang.pdf>
15. Lun PD med A. Diabetische Nephropathie - zu spät erkannt? [Internet]. DocCheck. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://www.doccheck.com/de/detail/documents/3866-diabetische-nephropathie-zu-spaet-erkannt>
16. Saleem T, Dahpy M, Ezzat G, Abdelrahman G, Abdel-Aziz E, Farghaly R. The Profile of Plasma Free Amino Acids in Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin

Resistance: Association with Microalbuminuria and Macroalbuminuria. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019 Jul;188(3):854–67.

17. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes.* 1983 May;32 Suppl 2:64–78.

18. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.

19. Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft Für Allgemeinmedizin Und Familienmedizin (DEGAM), Deutsche Gesellschaft Für Gefäßchirurgie Und Gefäßmedizin (DGG), Deutsche Gesellschaft Für Innere Medizin (DGIM) (Vertreten Durch Die DDG), Deutsche Gesellschaft Für Nephrologie (DGfN), et al. Nationale VersorgungsLeitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung, 1. Auflage [Internet]. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2010 [cited 2021 Dec 6]. Available from: <http://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/diabetes-mellitus/dm-nierenerkrankungen-1aufl-vers6-lang.pdf>

20. Busch M, Mann J, Wolf G. KDIGO-Leitlinie zur Behandlung des Diabetes mellitus bei chronischer Nierenerkrankung: Deutsche Übersetzung und Kurzfassung. *Nephrol* [Internet]. 2021 May [cited 2022 Apr 15];16(3):169–76. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11560-021-00498-y>

21. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2022 Apr 15];28(1):164–76. Available from: <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.164>

22. Roth K. Grundlagen der NMR-Spektroskopie. In: *NMR-Tomographie und -Spektroskopie in der Medizin* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin

Heidelberg; 1984 [cited 2021 Jun 28]. p. 5–30. Available from:

[http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-00120-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-00120-2_2)

23. Spektroskopie [Internet]. [cited 2021 Jun 30]. Available from:

<https://www.spektrum.de/lexikon/physik/spektroskopie/13557>

24. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al.

Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR

spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat Protoc.

2007;2(11):2692–703.

25. NMR-Spektrometer [Internet]. [cited 2021 Jul 1]. Available from:

<https://www.spektrum.de/lexikon/physik/nmr-spektrometer/10391>

26. Friebolin H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung.

5.Auflage. 2013.

27. 2D-NMR-Spektroskopie - Chemgapedia [Internet]. [cited 2021 Jul 1]. Available from:

[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/nmr\\_spek/zweidimensionale\\_nmr.vlu.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/zweidimensionale_nmr.vlu.html)

28. Otto M. Analytische Chemie. John Wiley & Sons; 2011. 695 p.

29. Avance Beginners Guide - Einführung in Theorie und Terminologie [Internet].

[cited 2021 Oct 9]. Available from:

[http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/54043195572894603.html)

[US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/54043195572894603.html](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/54043195572894603.html)

30. Günther H. NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry. John Wiley & Sons; 2013. 909 p.

31. Avance Beginners Guide - FID und Spektrum [Internet]. [cited 2021 Oct 9].

Available from: [http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/18014398879323275.html)

[US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/18014398879323275.html](http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/en-US/html/Avance%20Beginners%20Guide/de/18014398879323275.html)

32. Titze S, Schmid M, Kottgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Jan 25];30(3):441–51. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfu294>
33. Ziel › German Chronic Kidney Disease (GCKD) [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.gckd.de/studienhintergrund/ziel/>
34. Eckardt KU, Barthlein B, Baid-Agrawal S, Beck A, Busch M, Eitner F, et al. The German Chronic Kidney Disease (GCKD) study: design and methods. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2012 Apr;27(4):1454–60.
35. Titze S, Schmid M, Köttgen A, Busch M, Floege J, Wanner C, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2015 Mar;30(3):441–51.
36. Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz [Internet]. [cited 2021 Jul 6]. Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/carr-purcell-meiboom-gill-sequenz/2194>
37. Products | Chenomx Inc [Internet]. [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.chenomx.com/products/>
38. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003 Jan;63(1):225–32.
39. Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. *QuaSi-Niere Jahresbericht 2005/2006*.
40. Freedman BI, Bostrom M, Daeihagh P, Bowden DW. Genetic factors in diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2007 Nov;2(6):1306–16.

41. Nicht angegeben. The Merck Manual. 20. Auflage. Kenilworth: Merck Sharp & Dohme; 2018. S. 2117.
42. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Mikroalbuminurie: Frühwarnsystem für den nierenkranken Diabetiker [Internet]. Deutsches Ärzteblatt. 2003 [cited 2021 Nov 2]. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/36604/Mikroalbuminurie-Fruehwarnsystem-fuer-den-nierenkranken-Diabetiker>
43. Kwiendacz H, Nabrdalik K, Stompór T, Gumprecht J. What do we know about biomarkers in diabetic kidney disease? *Endokrynol Pol.* 2020;71(6):545–50.
44. Barutta F, Bellini S, Canepa S, Durazzo M, Gruden G. Novel biomarkers of diabetic kidney disease: current status and potential clinical application. *Acta Diabetol.* 2021 Jul;58(7):819–30.
45. Tsai IT, Wu CC, Hung WC, Lee TL, Hsuan CF, Wei CT, et al. FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy. *Int J Med Sci.* 2020;17(15):2338–45.
46. Luo S, Coresh J, Tin A, Rebholz CM, Appel LJ, Chen J, et al. Serum Metabolomic Alterations Associated with Proteinuria in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2019 Mar 7;14(3):342–53.
47. Haukka JK, Sandholm N, Forsblom C, Cobb JE, Groop PH, Ferrannini E. Metabolomic Profile Predicts Development of Microalbuminuria in Individuals with Type 1 Diabetes. *Sci Rep [Internet].* 2018 Sep 14 [cited 2021 Nov 30];8(1):13853. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-32085-y>
48. Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJL, Neuwirt H, Mayer B, Mayer G, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review: Validity of biomarkers of nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med [Internet].* 2012 May [cited 2022 Jan 14];29(5):567–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-5491.2011.03437.x>

49. Beige J, Drube J, von der Leyen H, Pape L, Rupprecht H. [Early detection by urinary proteome analysis : A new concept in patient management of diabetic nephropathy]. *Internist*. 2020 Oct;61(10):1094–105.
50. Argilés Á, Siwy J, Duranton F, Gayrard N, Dakna M, Lundin U, et al. CKD273, a new proteomics classifier assessing CKD and its prognosis. *PloS One*. 2013;8(5):e62837.
51. Kern EFO, Erhard P, Sun W, Genuth S, Weiss MF. Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2010 May;55(5):824–34.
52. Coughlan MT, Patel SK, Jerums G, Penfold SA, Nguyen TV, Sourris KC, et al. Advanced Glycation Urinary Protein-Bound Biomarkers and Severity of Diabetic Nephropathy in Man. *Am J Nephrol [Internet]*. 2011 [cited 2022 Jan 14];34(4):347–55. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/331064>
53. Coughlan MT, Forbes JM. Temporal Increases in Urinary Carboxymethyllysine Correlate with Albuminuria Development in Diabetes. *Am J Nephrol [Internet]*. 2011 [cited 2022 Jan 14];34(1):9–17. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/328581>
54. Critselis E, Lambers Heerspink H. Utility of the CKD273 peptide classifier in predicting chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant [Internet]*. 2015 Mar 19 [cited 2022 Apr 18];gfv062. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfv062>
55. Pontillo C, Jacobs L, Staessen JA, Schanstra JP, Rossing P, Heerspink HJL, et al. A urinary proteome-based classifier for the early detection of decline in glomerular filtration. *Nephrol Dial Transplant [Internet]*. 2016 Jul 6 [cited 2022 Apr 18];gfw239. Available from: <http://ndt.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/ndt/gfw239>
56. Züribig P, Mischak H, Menne J, Haller H. CKD273 Enables Efficient Prediction of Diabetic Nephropathy in Nonalbuminuric Patients. *Diabetes Care [Internet]*. 2019

Jan 1 [cited 2022 Apr 18];42(1):e4–5. Available from:  
<https://diabetesjournals.org/care/article/42/1/e4/36306/CKD273-Enables-Efficient-Prediction-of-Diabetic>

57. Panduru NM, Forsblom C, Saraheimo M, Thorn L, Bierhaus A, Humpert PM, et al. Urinary Liver-Type Fatty Acid–Binding Protein and Progression of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2013 Jun 12 [cited 2022 Apr 18];36(7):2077–83. Available from: <https://doi.org/10.2337/dc12-1868>

58. Sato R, Suzuki Y, Takahashi G, Kojika M, Inoue Y, Endo S. A newly developed kit for the measurement of urinary liver-type fatty acid-binding protein as a biomarker for acute kidney injury in patients with critical care. *J Infect Chemother* [Internet]. 2015 Mar [cited 2022 Apr 18];21(3):165–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X14003912>

59. Ruster, Christiane, Wolf, Gunter. Prävention der diabetischen Nephropathie: Was ist praktisch machbar? *Dtsch Ärztebl* 2015 [Internet]. 2015 Apr 24 [cited 2022 Jan 13];112(17). Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/169309/Praevention-der-diabetischen-Nephropathie-Was-ist-praktisch-machbar>

60. Bakris GL, Toto RD, McCullough PA, Rocha R, Purkayastha D, Davis P, et al. Effects of different ACE inhibitor combinations on albuminuria: results of the GUARD study. *Kidney Int*. 2008 Jun;73(11):1303–9.

61. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Glomeruläre Filtrationsrate: Fallstricke der Berechnung [Internet]. *Deutsches Ärzteblatt*. 2016 [cited 2022 Apr 18]. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/181215/Glomerulaere-Filtrationsrate-Fallstricke-der-Berechnung>

62. Jeong TD, Lee W, Chun S, Lee SK, Ryu JS, Min WK, et al. Comparison of the MDRD Study and CKD-EPI Equations for the Estimation of the Glomerular Filtration Rate in the Korean General Population: The Fifth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V-1), 2010. *Kidney Blood Press Res* [Internet]. 2013 [cited 2022 Apr 18];37(4–5):443–50. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/355724>

63. Low S, Zhang X, Ang K, Yeo SJD, Lim GJ, Yeoh LY, et al. Discovery and validation of serum creatinine variability as novel biomarker for predicting onset of albuminuria in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2018 Apr [cited 2022 Jan 14];138:8–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882271731392X>
64. Zhang S, Li X, Luo H, Fang ZZ, Ai H. Role of aromatic amino acids in pathogenesis of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2020 Oct;34(10):107667.
65. Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 Jan 13];17(4):448–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2307>
66. Yang B, Liu D, Zhu Li C, You Liu F, Ming Peng Y, Sheng Jiang Y. 1-Methylhydantoin Cytotoxicity on Renal Proximal Tubular Cells in Vitro. *Ren Fail* [Internet]. 2007 Jan [cited 2022 Jan 20];29(8):1025–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08860220701641272>
67. Feng Q, Li Y, Yang Y, Feng J. Urine Metabolomics Analysis in Patients With Normoalbuminuric Diabetic Kidney Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2020 Oct 6 [cited 2022 Jan 15];11:578799. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.578799/full>
68. Teerlink T, W.T. Hennekes M, Mulder C, Brulez HFH. Determination of dimethylamine in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App* [Internet]. 1997 Apr [cited 2022 Jan 14];691(2):269–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434796004768>
69. Tsikas D, Thum T, Becker T, Pham VV, Chobanyan K, Mitschke A, et al. Accurate quantification of dimethylamine (DMA) in human urine by gas chromatography–mass spectrometry as pentafluorobenzamide derivative: Evaluation of the relationship between DMA and its precursor asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease. *J Chromatogr B* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Jan

22];851(1–2):229–39. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023206007574>

70. Mitchell SC, Zhang AQ, Smith RL. Dimethylamine and diet. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2008 May [cited 2022 Jan 15];46(5):1734–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691508000215>

71. Zhang AQ, Mitchell SC, Barrett T, Ayesh R, Smith RL. Fate of dimethylamine in man. *Xenobiotica* [Internet]. 1994 Jan [cited 2022 Jan 22];24(4):379–87. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00498259409045901>

72. Simenhoff M. AMINE METABOLISM AND THE SMALL BOWEL IN UREMIA. *The Lancet* [Internet]. 1976 Oct [cited 2022 Jan 21];308(7990):818–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673676912071>

73. Durantou F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2022 Jan 22];23(7):1258–70. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2011121175>

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Beteiligten danken, die mich beim Gelingen meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfram Gronwald, der als Doktorvater mit außergewöhnlich guter Betreuung diese Arbeit möglich gemacht hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Angestellten am Institut für funktionelle Genomik für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Es gab zu jeder Zeit einen Ansprechpartner, der bei Problemlösungen bei der NMR-Spektroskopie und den Quantifizierungssoftwares zur Verfügung stand.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen dem innersten Kreis an Menschen, die mich im Geiste unterstützt haben.

# Lebenslauf

## Iris Lang

Geboren am 31.05.1992 in Nürnberg

### Schulbildung

09/2013                      allgemeine Hochschulreife am Steigerwald Landschulheim  
Wiesentheid

### Studium

09/2014-08/2017            Vorklinik Zahnmedizin Universität UMFT Victor Babes  
(Timisoara, Rumänien)

09/2017-07/2021            Klinisches Studium Zahnmedizin Universität Regensburg

10/2019                      Beginn der Promotion am Institut der funktionellen  
Genomik, Universität Regensburg

## Eidesstattliche Erklärung

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Wolfram Gronwald angeregt und bei der Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit mit dem Titel:

„Metabolisches Profiling mittels NMR-Spektroskopie zur Vorhersage einer zukünftigen Proteinurie bei Diabetikern mit Chronischer Nierenerkrankung“

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort/Datum, Unterschrift)