
Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern

Dennis André Ballwieser



München 2012

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Christoph Klein

Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Dennis André Ballwieser
aus Frankfurt am Main

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. Adelbert A. Roscher

Mitberichterstatter: Privatdozent Dr. Volker Vielhauer

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin Dr. Judith Glöckner-Pagel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung	2
1.1.1 Akutes Nierenversagen	2
1.1.2 Akutes Nierenversagen bei Kindern	8
1.1.3 Hitzeschockproteine	12
1.1.4 Hsp72	12
1.1.5 Hintergründe	14
1.2 Fragestellung	17
2 Studie	19
2.1 Studiendesign	20
2.1.1 Studienpopulation	20
2.1.2 Hypothese	20
2.1.3 Nullhypothese	20
2.1.4 Design	20
2.1.5 Untersuchungen	23
2.1.6 Statistik	24
2.1.7 Weitere Regelungen	24
3 Material & Methoden	27
3.1 Probengewinnung	27
3.1.1 Urin	27
3.1.2 Blut	27
3.2 Probenuntersuchung	27
3.2.1 Gelelektrophorese (SDS-PAGE) & Western-Blot	28
3.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)	29
3.2.3 Molekulargenetische Analyse	30
3.2.4 Statistische Analyse	32
4 Ergebnisse	37
4.1 Akutes Nierenversagen	37
4.2 Hsp72 im Urin	37
4.3 Molekulargenetischer Producerstatus	38
4.4 Daten	40

4.5	Statistik	42
4.5.1	Genetik vs. Hsp72 im Urin	42
4.5.2	ANV vs. Hsp72 im Urin	44
4.6	Fallzahlberechnung	46
5	Diskussion	47
5.1	Akutes Nierenversagen und Hsp72 im Urin	47
5.2	Hsp72 im Urin und molekulargenetischer Producerstatus für Hsp72	47
5.3	Fallzahlberechnung	48
5.4	Analyse	48
5.5	Ausblick	49
5.5.1	Prognostischer Faktor für das akute Nierenversagen	49
5.5.2	Hsp72 als prognostischer Faktor für das akute Nierenversagen	50
5.5.3	Aktive Sekretion vs. passive Freisetzung	50
5.5.4	Hsp72 und TLR4	51
5.5.5	Hsp72 und Geranyl-Geranyl-Aceton	51
5.5.6	Hsp72-Studie	52
6	Anhang	53
6.1	Studiendesign	53
6.1.1	Generelle Information	53
6.1.2	Hintergrundinformation	54
6.1.3	Ziel der Studie	55
6.1.4	Design	56
6.1.5	Untersuchungen	58
6.1.6	Patientensicherheit	58
6.1.7	Statistik	59
6.2	Ethikantrag	62
6.2.1	Formalia	62
6.2.2	Spezielle Angaben zum Forschungsvorhaben	64
6.2.3	Anlagen	71
6.3	Ethikvotum	71
6.4	Patienteninformation	73
6.4.1	Deutsche Version	73
6.4.2	Englische Version	76
	Literaturverzeichnis	81
	Danksagung	87

Abbildungsverzeichnis

1	Western Blot gegen Hsp72 qualitativ im Urin für Patient ID2. Acht Proben, kein Hsp72 im Urin.	38
2	Western Blot gegen Hsp72 qualitativ im Urin für Patienten ID52 und ID53. ID52: Vier Proben, abnehmende Hsp72-Mengen im Urin. ID53: Drei Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag.	39
3	ELISA auf Hsp72 qualitativ im Urin. X: Tag. Y: Konzentration von Hsp72 im Urin. ID2: Acht Proben, kein Hsp72 im Urin. ID52: Vier Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag. ID53: Vier Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag.	39
4	Zusammenhang zwischen Hsp72 im Urin und genetischem Status (15 vollständige Fälle eingeschlossen).	43
5	Zusammenhang zwischen Hsp72 im Urin und ANV (22 Fälle eingeschlossen).	45
6	Faksimile des Schreibens des Ethikkommissionsvorsitzenden vom 28.09.2005.	72

Tabellenverzeichnis

1	RIFLE-Kriterien für das akute Nierenversagen bei Erwachsenen, modifiziert wiedergegeben nach Lameire et al. ³⁴	9
2	pRIFLE-Kriterien für das akute Nierenversagen bei Kindern, modifiziert wiedergegeben nach Akcan-Arikan et al. ²	9
3	Einschlusskriterien für die HSP-Studie, Kriterien für Sepsis, SIRS und Schock modifiziert nach Goldstein et al ²⁶ . SIRS = <i>Systemic Inflammatory Response Syndrom</i> . SD = Standardabweichung.	22
4	Gele für Gelelektrophorese (SDS-PAGE).	32
5	Puffer für Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.	33
6	Antikörper für den Western-Blot.	34
7	Ansatz für die PCR.	34
8	Ansatz für die PCR-Restriktion.	34
9	Für die PCR verwendete Primer.	34
10	Ansatz für einprozentiges Agarosegel.	35
11	Zuordnung des molekulargenetischen Ergebnisses zum Producerstatus. . . .	40
12	Daten der 22 bis September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Probanden. N/A: Zu wenig oder kein Blut für die molekulargenetische Analyse vorhanden.	41
13	Kreuztabellierung der drei Faktoren (15 vollständige Fälle eingeschlossen).	42
14	Aufstellung des Zusammenhangs zwischen Hsp72 im Urin und genetischem Status (15 vollständige Fälle eingeschlossen).	42
15	Aufstellung des Zusammenhangs zwischen Hsp72 im Urin und ANV (22 Fälle eingeschlossen).	44
16	Allelhäufigkeit	48

Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen (ANV) ist bei schwer kranken Kindern eine relativ häufige Komplikation. Durch ein ANV erhöht sich die Gefahr von Multiorganversagen und Mortalität. Prognosefaktoren sind ebenso unbekannt wie eine ursächliche Therapie. In der Vergangenheit sind verschiedene Biomarker als Kandidaten zur frühzeitigen Diagnose von ANV untersucht worden, beispielsweise Interleukin 18, die intestinale Form der alkalischen Phosphatase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase, Alaninaminopeptidase und das *Kidney Injury Molecule 1*. Keiner dieser Biomarker kann bislang als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens herangezogen werden. Hitzeschockproteine (HSP) sind Zellschutzproteine, so genannte Chaperone, die bei Zellstress Zellstrukturen stabilisieren und die Apoptose verhindern können. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass HSP mit einer Größe um 72 kDa (Hsp72) beim akuten Nierenversagen bei Tieren, bei Frühgeborenen und bei nierentransplantierten pädiatrischen Patienten im Urin nachweisbar sind. Hsp72 ist daher ein Kandidat für einen prognostischen Faktor des ANV bei pädiatrischen Patienten, den es zu untersuchen lohnt.

Für diese Arbeit wurde eine klinische Beobachtungsstudie neu entwickelt und durchgeführt, deren Ergebnisse hier präsentiert und ausgewertet werden. Für die »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)« wurde methodisch eine statistische Korrelation zwischen dem Auftreten von Hsp72 im Urin schwer kranker Kinder und dem Ausbleiben eines ANV gesucht. Eingeschlossen wurden bis zu 18 Jahre alte Patienten mit Schock, Sepsis oder Asphyxie und ohne bestehende Nierenerkrankung oder Nierentransplantation. Die Patienten wurden von der Aufnahme auf die Intensivstation bis zur Verlegung oder bis zum Tod beobachtet. Tägliche Proben aus dem Sammelurin wurden mittels Western Blot und Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) qualitativ auf das Vorkommen von Hsp72 untersucht. Aus einer Blutprobe wurde der molekulargenetische Producerstatus (Normal- oder Low-Producer) für Hsp72 der Probanden ermittelt.

Für die HSP-Studie wurden seit September 2005 Patienten rekrutiert. Zum September 2009 erfolgte eine Zwischenauswertung der 22 bislang eingeschlossenen Patienten. Die Arbeit muss als »Proof-of-Principle«-Studie verstanden werden, da sich bisher in den Ergebnissen keine statistisch nachweisbare Korrelation zwischen dem Auftreten von Hsp72 im Urin und dem klinischen Verlauf der Patienten zeigt. Mit Hilfe der Ergebnisse ist erstmals eine präzise Fallzahlberechnung für eine weiterführende multizentrische Studie zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern möglich. Diskutiert werden neben der zu planenden Fortführung der HSP-Studie zellbiologische Versuche, die Aufschluss über den Zusammenhang zwischen ischämischem Zellstress, der beim ANV entsteht, und protektiven Effekten von HSP erbringen könnten.

1 Einleitung

Für den menschlichen Organismus ist der akute Sauerstoffmangel eine existenzielle Bedrohung. Wie für das Gesamtsystem gilt dies auch für die kleinste eigenständige Einheit des Körpers, die Zelle. Die ischämische tubuläre Nekrose ist eines der Hauptprobleme beim akuten Nierenversagen (ANV)⁴⁸, einer häufigen und mit hoher Mortalität belasteten Komplikation schwer kranker pädiatrischer Patienten⁴.

Um die Zelle nach einem ischämischen Schaden zu retten, stehen unter anderem die so genannten Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, HSP) zur Verfügung. Sie leisten im Notfall zelluläre Erste Hilfe, um beschädigte, aber reparaturfähige Proteine vor dem Abbau und die Zelle vor dem Auslösen der Apoptosekaskade zu bewahren⁵.

Bis heute ist die Rolle der Hitzeschockproteine bei der Zellreparatur nicht vollständig entschlüsselt. Sie fungieren als so genannte Chaperone, die bei der Faltung von Proteinen bedeutsam sind. Die am besten untersuchten Hitzeschockproteine mit einer Größe um 70 kDa binden an entstehende und unfertige Proteine und schützen diese so vor dem Abbau. Hitzeschockproteine sind ganz im Sinne der Ersten Hilfe ungerichtete Schutzproteine, deren Einsatz ohne ihnen nachfolgende gezielt agierende Proteine den Zelltod nicht verhindern kann.⁵ Eine eventuelle Rolle von Hitzeschockproteinen beim pädiatrischen akuten Nierenversagen ist bislang nur wenig untersucht.⁶

Mit Hilfe einer beobachtenden Fall-Kontroll-Studie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München eine Beobachtungsstudie zum »Proof of Principle« der möglichen Eignung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern geplant, organisiert, durchgeführt und vorläufig ausgewertet.

Ziel der Studie ist es, zu klären ob Hitzeschockproteine der Größenklasse um 72 kDa (Hsp72) einen positiven Einfluss auf Entstehen und Ergebnis eines akuten Nierenversagens bei schwer kranken Kindern haben könnten. Die »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)« läuft seit September 2005, die Zwischenauswertung erfolgt zum Stichtag 20. September 2009.

Hintergrund und Fragestellung der Studie werden erörtert und erste Ergebnisse vorgestellt. Anhand der vorläufigen Resultate erfolgt die Berechnung einer Fallzahl für eine noch zu planende weiterführende klinische Studie. Mögliche experimentelle Ansätze werden beschrieben, mit denen die Rolle der Hitzeschockproteine für das akute Nierenversagen bei Kindern weiter entschlüsselt werden kann.

1.1 Problemstellung

Bis heute gibt es keinen klinisch messbaren, zuverlässigen prognostischen Faktor für die Entwicklung eines akuten Nierenversagens, weder bei Kindern⁴ noch bei erwachsenen Patienten³⁴. Ein solcher Parameter wäre von großem prognostischen Wert als Steuerungsinstrument in der Therapie⁴⁸.

In der Vergangenheit sind verschiedene Biomarker als Kandidaten zur zuverlässigen frühzeitigen Diagnose des akuten Nierenversagens untersucht worden, beispielsweise Interleukin 18, die intestinale Form der alkalischen Phosphatase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase, Alaninaminopeptidase und das *Kidney Injury Molecule 1*^{34;48}. Keiner dieser Biomarker kann bislang als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens herangezogen werden.

Bei der Suche nach Kandidaten für einen solchen prognostischen Faktor fallen Chaperone aus der Familie der Hitzeschockproteine auf: Sie spielen eine bedeutende pathophysiologische Rolle bei der Entstehung des akuten Nierenversagens und könnten zugleich einen Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien bieten.⁶

1.1.1 Akutes Nierenversagen

Als akutes Nierenversagen wird der Zustand des menschlichen Körpers bezeichnet, in dem die Niere – in Abgrenzung zum schleichend entstehenden chronischen Nierenversagen unterschiedlicher Genese – plötzlich nicht mehr in der Lage ist, den Flüssigkeitshaushalt und damit die Elektrolythämostasie aufrechtzuerhalten^{3;10}. Harnpflichtige Substanzen können nicht mehr eliminiert, der Urin nicht mehr konzentriert werden⁴⁸. Die Ursachen für ein akutes Nierenversagen sind vielfältiger Natur und lassen sich in prärenales, intrarenales und postrenales akutes Nierenversagen unterteilen^{10;18}. Beim akuten Nierenversagen fällt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) innerhalb von Minuten bis Tagen drastisch ab.¹ Ist das akute Nierenversagen manifest, liegt sie unter $10 \text{ ml}/\text{min}$ ⁴⁸. Infolgedessen steigt die Menge der filtrationspflichtigen Substanzen im Serum an¹. Die glomeruläre Filtrationsrate wird maßgeblich von der Druckdifferenz zwischen den afferenten und den efferenten Arteriole im glomerulären Kapillarbett der Niere bestimmt, dem so genannten transkapillären Filtrationsdruck⁴⁸. Als Marker der glomerulären Filtrationsrate werden im klinischen Alltag vor allem Kreatinin im Serum und Harnstoff im Serum sowie die Kreatininclearance bestimmt.^{18;34}

Bei der prärenalen Variante des akuten Nierenversagens steigen Kreatinin und Harnstoff im Serum an, weil die Nierendurchblutung sinkt und dadurch die glomeruläre Filtrationsrate der Nieren reduziert ist³⁴. Intrarenales Nierenversagen kann verschiedenste Ursachen haben, die alle Strukturen des Nephrons betreffen können³⁴. Die häufigste Ursache ist die akute tubuläre Nekrose beim ischämischen Insult der Niere, während der Glomerulus selbst meist nicht betroffen ist⁴⁸. Bei der postrenalen Variante des akuten Nierenversagens schließlich ist eine postrenale Obstruktion Auslöser eines mechanischen Staus der harnpflichtigen Substanzen mit folgendem Versagen der Filterfunktion in der gestauten Niere³⁴.

Definition Es gibt keine eindeutige, universell anerkannte Definition des akuten Nierenversagens¹⁰. Beim akuten Nierenversagen werden stickstoffhaltige und stickstofffreie Stoffwechselabbauprodukte nicht mehr über den Urin ausgeschieden. Dadurch drohen metabolische Störungen wie z. B. Azidose, Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und Störungen des Wasserhaushalts¹⁸.

Für das akute Nierenversagen beim Erwachsenen wird seit 2007 die RIFLE-Klassifikation¹³ vorgeschlagen, die in Tabelle 1 wiedergegeben ist. Für pädiatrische Patienten gibt es ebenfalls seit 2007 einen adaptierten Vorschlag der RIFLE-Klassifikation (pRIFLE)², der jedoch in der HSP-Studie nicht berücksichtigt wird, da diese Einteilung erst nach dem Erstellen des Studiendesigns der HSP-Studie im Sommer 2005 erarbeitet und veröffentlicht wurde. Die pädiatrische Version der RIFLE-Klassifikation ist zu Übersichtszwecken dennoch in Tabelle 2 aufgeführt.

Für die HSP-Studie wird eine 2005 im Rahmen einer internationalen pädiatrischen Konsensuskonferenz erarbeitete Definition²⁶ des akuten Nierenversagens modifiziert angewendet. Goldstein et al. geben als Kriterien für ein akutes Nierenversagen den Anstieg des Serumkreatinins auf mehr als das Doppelte des altersadaptierten oberen Normwertes bzw. eine Verdoppelung gegenüber dem Ausgangswert an²⁶. Das Kriterium der HSP-Studie für das Vorliegen eines akuten Nierenversagens ist allein die Verdoppelung des Serumkreatininspiegels gegenüber dem Ausgangswert.

Epidemiologie Prärenale Azotämie und tubuläre Nekrose sind für 75 % der Fälle akuten Nierenversagens verantwortlich³⁴, wobei sich etwa ein Fünftel der Fälle auf prärenales Nierenversagen und weitere 45 % auf die akute tubuläre Nekrose verteilen⁴. Bei Erwachsenen wird die Häufigkeit des akuten Nierenversagens in einer Spanne von 172 bis 620 Fällen pro Millionen Menschen und Jahr angegeben³⁴. Schätzungen gehen davon aus, dass zwischen fünf und 20 % aller kritisch kranken Patienten ein akutes Nierenversagen erleiden³⁴. Besonders gefährdet sind septische Patienten: bei 23 % der schwer septischen Patienten und 51 % der Patienten im septischen Schock mit bakterienpositiven Blutkulturen kommt es zum akuten Nierenversagen^{34;47}.

Die häufigsten Ursachen für akutes Nierenversagen beim Erwachsenen sind hypoxisch-ischämische Zwischenfälle und nephrotoxische Insulte³. Ein Drittel bis die Hälfte aller Fälle tubulärer Nekrosen auf Intensivstationen können auf eine Sepsis zurückgeführt werden³⁴. In der Mehrzahl der Fälle kommt es nicht alleine zum akuten Nierenversagen, sondern mindestens ein weiteres Organ ist mitbetroffen³⁴. Ein Fünftel bis ein Viertel aller Fälle von im Krankenhaus aufgetretenen akuten tubulären Nekrosen entsteht nach chirurgischen Eingriffen³⁴. Die dritte größere Gruppe akuter tubulärer Nekrosen wird durch radiologische Kontrastmittel ausgelöst³⁴.

Akutes prärenales Nierenversagen Zur prärenaln Azotämie kommt es bei verschiedensten Krankheiten durch einen tatsächlichen oder relativen Blutmangel und die folgende Minderperfusion der Niere, wobei das Nierengewebe und zunächst auch seine Funktionsfähigkeit erhalten bleiben. Die Ursachen für ein prärenales Nierenversagen sind vielfältig:

z. B. Blutungen, Dehydrierung, Sepsis, Verbrennung, Trauma, *Capillary Leak Syndrome* und Diabetes insipidus. Ausgelöst werden kann ein prärenales Nierenversagen ebenfalls durch Medikamente, die den renalen Blutfluss minimieren (z. B. nichtsteroidale Antiphlogistika, *non-steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID), vor allem in Verbindung mit kardiovaskulären Krankheiten bei älteren Patienten. Der renale Blutfluss wird von der Niere autoregulierte: Bei sinkendem Blutdruck weiten sich die präglomerulären Arteriolen, ausgelöst durch in der Niere produziertes Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid (NO). So lange wie möglich wird die glomeruläre Filtrationsrate aufrechterhalten. Kommt es zum raschen Volumenverlust, wird die glomeruläre Filtrationsrate durch das tubuloglomeruläre Feedback vermindert.^{10;34}

Akutes postrenales Nierenversagen Häufigste Ursache eines akuten postrenalen Nierenversagens ist eine Obstruktion der abführenden Harnwege. Die Prognose ist im Vergleich zu anderen Formen des akuten Nierenversagens besser. Ist die Obstruktion beseitigt, kommt es zur überschießenden kompensatorischen Polyurie, in dieser Phase droht ein Volumenmangel und ein Entgleisen der Serumelektrolyte.³⁴

Akutes intrarenales Nierenversagen Die Ursachen für eine akute tubuläre Nekrose und ein dadurch ausgelöstes akutes intrarenales Nierenversagen sind vielfältig. In Industrieländern sind vor allem Traumata und nephrotoxische Substanzen die Ursache, die meist zum ischämischen Insult führen^{34;48}. Bei der akuten tubulären Nekrose sinkt die glomeruläre Filtrationsrate rasch durch intrarenale Vasokonstriktion mit sukzessive fallendem Filtrationsdruck, vaskuläre Verstopfung in der äußeren Medulla, Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks und tubuläre Obstruktion, transtubulären Rückfluss des Filtrates und eine interstitielle Entzündung³⁴. Gleichzeitig mit der Abnahme des renalen Blutflusses steigt der Sauerstoffbedarf des Tubulus relativ an, kann aber nicht befriedigt werden⁴⁸. Während beim prärenalen akuten Nierenversagen die Nierenfunktion mit der renalen Perfusion wiederhergestellt ist, kommt es bei der akuten tubulären Nekrose zu einem erheblichen intrinsischen Schaden⁴.

Bei der akuten tubulären Nekrose auf dem Boden einer Sepsis folgt auf eine anfängliche hyperinflammatorische Reaktion des Körpers eine hypoinflammatorische Reaktion³⁴. Hämodynamisch steht die Vasodilatation mit einem Verlust der systemischen Resistance im Vordergrund^{34;48}. Endotoxine können über Endothelin einen Flüssigkeitsverlust über die Kapillarmembranen verursachen, wodurch das Plasmavolumen vermindert wird³⁴. Sowohl über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) als auch durch vermehrtes Ausschütten von Vasopressoren versucht der Körper, den Blutdruck aufrecht zu erhalten, was gleichzeitig das akute Nierenversagen befördern kann, da offenbar die Niere in diesem Zustand übersteigert auf körpereigene Vasopressoren reagiert^{34;47;48}. In der Frühphase des akuten Nierenversagens scheint in der Niere eine durch den Verlust der renalen Autoregulation bedingte Vasokonstriktion vorzuherrschen, bei noch aufrechterhaltener tubulärer Funktion^{34;47}. In den afferenten Arteriolen der Niere steigt die zytosolische Kalziumkonzentration⁴⁸. Verschiedene weitere Faktoren (Mikrothrombi, von Willebrand-Faktor,

Endothelschäden) scheinen gemeinsam die Wirksamkeit der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) herabzusetzen, deren Produkt Stickstoffmonoxid (NO) eigentlich den vasokonstriktiven Effekten von Noradrenalin, Endothelin und Angiotensin II entgegenwirken sollte^{34;48}. Normalerweise erhalten die Nieren 25 % des kardialen Blutflusses, bei akuter tubulärer Nekrose ist der renale Blutfluss um ein Drittel bis die Hälfte reduziert, wobei besonders die äußere Medulla betroffen zu sein scheint^{34;48}. Schließlich kommt es zur ischämischen tubulären Nekrose, wenn der für eine ausreichende glomeruläre Filtrationsrate notwendige Blutfluss und der Filtrationsdruck nicht mehr aufrecht erhalten werden können³⁴. Entgegen der Namensgebung werden in histologischen Untersuchungen nur selten tatsächlich nekrotische Tubuluszellen gefunden⁴⁷.

Die (intra-)zellulären Abläufe bei der (post)-ischämischen akuten tubulären Nekrose sind bei Tieren ausführlich untersucht, allerdings ist immer noch unklar, inwieweit die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können³⁴. Die größten intrazellulären Schäden entstehen im S3-Segment des proximalen Tubulus¹⁷. Die tubuläre Störung alleine kann offenbar nicht für den Abfall der glomerulären Filtrationsrate verantwortlich sein, hierzu kommt es erst, wenn die Reabsorption von Na^+ im proximalen Tubulus deutlich sinkt, wofür der Verlust des Bürstensaums der Tubuluszellen entscheidend zu sein scheint⁴⁸.

Ausgangspunkt für den in Apoptose oder Nekrose mündenden Verfall der Zelle ist der durch die mangelnde Blutversorgung bedingte ATP-Abfall in der Zelle⁴, der den Tubulus aufgrund seines hohen Energieumsatzes besonders trifft³. Die steigende tubuläre Natriumkonzentration aktiviert den tubuloglomerulären Feedbackmechanismus und vermindert die glomeruläre Filtrationsrate weiter⁴⁸. Infolge der Ischämie kommt es in den Tubuluszellen zu typischen Zeichen der Nekrose: die Integrität des Zytoskeletts geht verloren, intrazellulär entstehen Vakuolen, die Polarität mit der Na^+ - K^+ -ATPase ausschließlich auf der basalen Zellseite wird aufgehoben und der epitheliale Bürstensaum geht verloren^{34;48}. Integrine wie Spektrin und Ankyrin sowie die basale Na^+ - K^+ -ATPase werden proteolytisch gelöst und nach apikal bzw. ins Zytoplasma verschoben, Adhäsionsmoleküle verlieren ihre Funktion^{34;48}. Durch diese Redistribution versagt der unidirektionale Flüssigkeitstransport durch die Zelle¹⁷. In der Zelle fallen reaktive Sauerstoffradikale an, die Endothelzellen stärker zu schädigen scheinen als Tubuluszellen⁴.

Ein interstitielles Ödem mit Leukozyteninfiltration folgt³⁴. Die Tubuluszellen lösen sich von der Basalmembran und verstärken so die tubuläre Obstruktion noch, außerdem kann Ultrafiltrat vermutlich in die Kapillaren zurückfließen, wenn der intratubuläre Druck aufgrund der Obstruktion steigt^{34;48}. Eine entscheidende Rolle für die tubuläre Verstopfung spielt offensichtlich das Tamm-Horsfall-Protein (THP), das im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife produziert wird und als Monomer in den Tubulus sekretiert wird, wo es bei erhöhten Na^+ -Konzentrationen gelartig den Tubulus verstopft⁴⁸. Auch den Hitzeschockproteinen kommt bei den zu Apoptose und Nekrose führenden Stoffwechselvorgängen in der Zelle offenbar eine wichtige Rolle zu, die noch nicht vollständig verstanden ist^{3;4}. Ihnen wird eine Rolle bei den Reparaturprozessen des Zellskeletts überlebender Zellen nach dem akuten Nierenversagen zugesprochen⁴. Subsequent werden verschiedene biochemische Stoffwechselwege aktiviert, die zur Apoptose und Nekrose führen^{34;48}.

Entzündungsvorgänge spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Abnahme der glo-

merulären Filtrationsrate. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) trägt offenbar zur tubulären Schädigung bei. Wird die iNOS blockiert, kommt es im Tierversuch zu weniger starken Schäden bei akuter renaler Ischämie. Auch durch die Blockade von iNOS (und das Bremsen einer Leukozyteninfiltration) durch α -Melanozyten-stimulierendes-Hormon (α -MSH) konnte ein Nierenschaden in Tierversuchen minimiert werden, ebenso durch Sauerstoffradikalfänger wie die Superoxiddismutase und Caspaseinhibitoren. Im Gegensatz zur iNOS scheint die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) einen protektiven Effekt gegen tubuläre Ischämieschäden zu haben, der die schädigenden Effekte der iNOS zu überwiegen scheint.⁴⁸

Nach dem Wiederherstellen des Blutflusses kommt es beim Abräumen der apoptotischen bzw. nekrotischen proximalen Tubuluszellen zur erhöhten Expression von Stresshormonen und dem vermehrten Einwandern von Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen³⁴. Beeinflusst wird die Entscheidung, ob die Zellen in die Apoptose eintreten oder ischämische Schäden reparieren können von verschiedenen Zellbotenstoffen, z. B. zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren wie p21, dem Stoffwechselweg der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) und Wachstumsfaktoren^{34;48}. Anschließend wandern zuvor ruhende Stammzellen ein, wonach es zur Proliferation kommt und das Epithel regeneriert wird³⁴.

Diagnose Die klinische Diagnose erfolgt entweder entsprechend den im Abschnitt 1.1.1 vorgestellten RIFLE bzw. den pRIFLE-Kriterien – die allerdings bei der HSP-Studie wie oben erläutert keine Anwendung finden – oder anhand der Verdoppelung des Serumkreatininwertes gegenüber dem Ausgangswert des Patienten und der Abnahme der Kreatinin-clearance unter klinikspezifische Referenzwerte.

In Ermangelung eines einfachen Markers für das akute Nierenversagen spielt die klinische Beurteilung des Patienten eine herausragende Rolle. Anamnese, körperliche Untersuchung, Labor- und Urinuntersuchung sind wegweisend.³⁴ Verschiedene Biomarker werden als potentielle diagnostische Marker des akuten Nierenversagens untersucht, unter anderem Kidney Injury Molecule-1, IL-18 und verschiedene tubuläre Enzyme⁴⁸.

Der offensichtlichste Hinweis auf ein akutes Nierenversagen sind Oligurie oder Anurie des Patienten, wobei ein akutes Nierenversagen auch bei normaler Harnmenge vorliegen kann³⁴.

Von den Laborwerten ist das harnpflichtige Stoffwechselprodukt Kreatinin im Serum klinisch der wichtigste Wert. Das Serumkreatinin ist abhängig von der Menge des im Muskelgewebe anfallenden Kreatinins, dem Volumenzustand des Körpers und der Clearance – wodurch die Verlässlichkeit des Wertes alleine eingeschränkt wird¹⁸. Insbesondere während des akuten Nierenversagens spiegelt das Serumkreatinin die glomeruläre Filtrationsrate nicht korrekt wieder³⁴. Ebenso steigt der Harnstoff im Serum beim akuten Nierenversagen deutlich an¹⁸. Cystatin C im Serum ist ein weiterer Marker für die glomeruläre Filtrationsrate, der klinisch noch nicht so weit verbreitet ist wie das Serumkreatinin³⁴. Im Gegensatz zum Kreatinin ist Cystatin C muskelunabhängig und daher besser reproduzierbar.

Prävention Eine gezielte Prävention gegenüber dem akuten Nierenversagen ist nicht möglich. Bei potentiell gefährdeten Patienten wird versucht, das intravasale Volumen und die kardiale Ejektionsfraktion so normal wie möglich zu halten und auf potentiell nieren-schädigende Medikamente wie NSAID, *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren), Angiotensin-II-Rezeptorblocker, Aminoglykoside oder Ciclosporin zu verzichten³⁴. Nutzen oder potentieller Schaden einer Volumenexpansion zur Prävention (bzw. auch zur Therapie) eines akuten Nierenversagens sind umstritten und bei vielen Patienten wegen Herz-Kreislauf-Krankheiten kein Mittel der Wahl^{34;48}. Allerdings gibt es Hinweise auf einen protektiven Effekt einer Flüssigkeitssubstitution im Stadium der prärenaln Azotämie, bevor ein tubuläres Nierenversagen eingetreten ist⁴⁷. Ein möglicher schützender Effekt von N-Acetylcystein ist umstritten³⁴. Bei ausgesuchten Diagnosen könnten Kalziumkanalblocker eventuell einen protektiven Effekt zeigen^{34;48}.

Therapie Die wichtigste therapeutische Option neben der supportiven Therapie ist die Nierenersatztherapie durch Hämofiltration oder Dialyse. Die kontinuierliche Nierenersatztherapie scheint der intermittierenden Nierenersatztherapie überlegen zu sein^{10;34;48}. Wichtig ist die Nierenersatztherapie vor allem, um der beim akuten Nierenversagen rasch entstehenden Hyperkaliämie entgegenzuwirken. Eine Beschränkung der Kaliumzufuhr und der Flüssigkeitsaufnahme gehören ebenso zur Behandlung. Bei gefährlich hohen Kaliumspiegeln verschieben eine Glukose-Insulin-Infusion oder eine Kalziuminfusion Kaliumionen in den intrazellulären Raum. Einer auftretenden Azidose kann mit Bikarbonat begegnet werden. Die ausreichende hochkalorische und an mittelkettigen Fettsäuren reiche Ernährung des Patienten ist ebenso entscheidend.^{10;34;48} Furosemid könnte durch einen erhöhten Urinfluss die tubuläre Obstruktion vermindern und durch die Blockade der Na^+ - K^+ -ATPase den Sauerstoffbedarf in der Niere herabsetzen⁴.

Medikamentös werden neben der oben genannten Volumenexpansion Diuretika wie Furosemid, Mannitol und Dopamin als renaler Vasodilator mit fraglichen Ergebnissen eingesetzt³⁴. Insbesondere für Dopamin haben prospektive kontrollierte Studien und Meta-Analysen ergeben, dass weder die Mortalität reduziert noch die Nierenfunktion verbessert werden^{10;34}. Untersucht werden – bislang ohne klinische Konsequenzen – als mögliche Therapieoptionen z. B. das atriale natriuretische Peptid (ANP), Theophyllin, epidermale Wachstumsfaktoren, melanozytenstimulierendes Hormon (MSH), *Hepatocyte Growth Factor*, *Insulin-Like Growth Factors* (z. B. IGF-1), Erythropoietin, Prostaglandine, Infusionen mit Aminosäuren und Antioxidanzien^{4;34}. Versuche mit *Insulin-Derived Growth Factor* zur besseren Regeneration nach akutem Nierenversagen, die im Tiermodell vielversprechend verliefen, konnten beim Menschen nicht reproduziert werden⁴⁸. Versuche mit Stammzellen wurden bei Tieren unternommen, Studien mit multipotenten mesenchymalen Stammzellen haben positive Ergebnisse erbracht^{4;48}. Klinische Studien an Patienten haben allerdings immer wieder ernüchternde Ergebnisse geliefert, z. B. mit atrialem natriuretischen Peptid oder IGF-1⁴.

Weil der Krankheitsverlauf der Patienten umso günstiger ist, je schneller eine Behandlung stattfindet, wären sensitive diagnostische Biomarker für das akute Nierenversagen

von großem therapeutischen Nutzen^{4;48}. Verschiedene Studien bei Tieren legen nahe, dass ein Bremsen der Entzündungsreaktion ein vielversprechender Ansatz der Behandlung des akuten Nierenversagens sein könnte⁴.

Prognose Die Prognose des akuten Nierenversagens ist schlecht⁴⁸. Ist eine Nierenersatztherapie notwendig, liegt die Sterblichkeit im Krankenhaus über 50 %³⁴. Kommt es zu einem akuten Nierenversagen auf dem Boden einer Sepsis, liegt die Sterblichkeit bei 70 %⁴⁸. Haupttodesursachen sind Infektionen und kardiopulmonale Komplikationen⁴⁸. Besonders hoch ist die Sterblichkeit bei Patienten mit Multiorganversagen (MOV)³⁴. Patienten, die sowohl eine hohe Konzentration von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) als auch einen genetischen *Low-Producer*-Status für Interleukin 10 (IL-10) aufweisen, haben ein höheres Sterbensrisiko als Patienten mit niedrigem Tumornekrosefaktor α und einer hohen Interleukin 10-Produktion³⁴. Es gibt Hinweise darauf, dass auch nach einer klinisch vollständigen Wiederherstellung der Nierenfunktion Patienten nach einem akuten Nierenversagen einem erhöhten Risiko für einen chronischen Verlust der Nierenfunktion ausgesetzt sind⁴.

Das Wiederherstellen der Nierenfunktion nach einem akuten Nierenversagen entscheidet über die langfristige Prognose des Patienten. Als wiederhergestellte Nierenfunktion wird häufig die Dialysefreiheit der Patienten angegeben. Studien in den 1990er-Jahren ergaben, dass die Überlebenden eines nierenersatztherapiepflichtigen akuten Nierenversagens ein hohes Risiko von bis zu 34,3 % trugen, lebenslang dialysepflichtig zu werden. Neuere Studien zeigen niedrigere Risiken, mit bleibender Dialysepflicht bei zwischen fünf und acht Prozent der Patienten. Eine entscheidende Rolle beim Überwinden eines akuten Nierenversagens ohne folgende Dialysepflicht könnte vor allem die dauerhafte Nierenersatztherapie statt einer intermittierenden Nierenersatztherapie während des akuten Nierenversagens spielen. Die Diskussionen, wann und wie die langfristigen Folgen nach einem akuten Nierenversagen überhaupt gemessen werden sollen und wie das Wiederherstellen der Nierenfunktion definiert werden soll, sind dabei noch nicht abgeschlossen.¹²

1.1.2 Akutes Nierenversagen bei Kindern

Die Zahl der Fälle akuten Nierenversagens bei Kindern scheint zuzunehmen⁴. Waren früher vor allem Kinder mit vorbestehenden renalen Krankheiten betroffen, spielen mittlerweile andere Ursachen eine größere Rolle⁴.

Bei Kindern kommt es bei hypoxischen bzw. ischämischen Insulten der Niere, hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) oder akuter Glomerulonephritis eher zu oligurischem bzw. anurischem Nierenversagen⁴. Akute interstitielle Nephritis und Schäden durch nephrotoxische Stoffe führen dagegen eher zu einem akuten Nierenversagen mit normaler Harnproduktion⁴. Nichtoligurisches Nierenversagen hat dabei eine höhere Mortalitätsrate als oligurisches Nierenversagen⁴. Bei Neugeborenen sind kortikale Nekrosen und renale Venenthrombosen häufiger Ursache eines akuten Nierenversagens, bei Kleinkindern das hämolytisch-urämisches Syndrom, bei älteren Kindern und Jugendlichen die rapid-progressive Glomerulonephritis (RPGN)⁴. Bei Neugeborenen spielen außerdem Medikamente, die die Mutter in der

	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	Urin
Risiko	1,5 × Ausgangs-Serumkreatinin	< 0,5ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 6h
Verletzung	2 × Ausgangs-Serumkreatinin	< 0,5ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 12h
Versagen	3 × Ausgangs-Serumkreatinin oder Kreatinin = 355 μmol/l, wenn ein Anstieg über >44 μmol/l vorausging	< 0,3ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 24h oder Anurie für 12h
Verlust	Dauerhaftes akutes Nierenversagen, kompletter Verlust der Nierenfunktion für mehr als vier Wochen	
Endstadium	Nierenversagen über mehr als drei Monate	

Tabelle 1: RIFLE-Kriterien für das akute Nierenversagen bei Erwachsenen, modifiziert wiedergegeben nach Lameire et al.³⁴.

	Geschätzte Clearance	Kreatinin-Urin
Risiko	um 25 % vermindert	< 0,5ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 8h
Verletzung	um 50 % vermindert	< 0,5ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 16h
Versagen	um 75 % vermindert oder geschätzte Kreatinin-clearance < 35ml/min/1,73m ²	< 0,3ml kg ⁻¹ h ⁻¹ für 24h oder Anurie für 12h
Verlust	Dauerhaftes akutes Nierenversagen, kompletter Verlust der Nierenfunktion für mehr als vier Wochen	
Endstadium	Nierenversagen über mehr als drei Monate	

Tabelle 2: pRIFLE-Kriterien für das akute Nierenversagen bei Kindern, modifiziert wiedergegeben nach Akcan-Arikan et al.².

Schwangerschaft eingenommen hat, eine Rolle, z. B. ACE-Hemmer, AT-II-Rezeptorblocker und NSAID⁴.

Epidemiologie Die genaue Inzidenz des akuten Nierenversagens bei Kindern ist ebenso unbekannt wie die genaue Zusammensetzung der Ursachen⁴. In der Literatur wird für Patienten auf pädiatrischen Intensivstationen angegeben, zwischen acht und 24 % der Patienten würden ein akutes Nierenversagen entwickeln³. Eine wichtige Rolle spielen Operationen⁴, eine weitere häufige Ursache ist das hämolytisch-urämische Syndrom^{3;10}. Es gibt allerdings keine epidemiologischen Studien, denen eine etablierte Definition des pädiatrischen akuten Nierenversagens zugrunde gelegen hätte⁴. Die Zahl der akuten Nierenversagen ist besonders hoch bei bereits hospitalisierten Kindern und Patienten auf Neugeborenen-Intensivstationen³.

Hypoxie, Ischämie und nephrotoxische Stoffe sind wichtige Ursachen des akuten Nierenversagens im Kindesalter, wobei das höchste Risiko bei Tumorpatienten mit Leukämien und Tumorlysesyndromen besteht⁴. Bei Neugeborenen mit schwerer Asphyxie besteht ein relativ hohes Risiko für akutes Nierenversagen, Studien geben für Neugeborene allgemein ein Risiko von bis zu einem Viertel aller Patienten an⁴. Weitere prädisponierende Faktoren sind sehr niedriges Geburtsgewicht (*very low birth weight*, VLBW; unter 1.500g), niedrige Apgar-Werte, ein persistierender Ductus arteriosus (*patent ductus arteriosus*, PDA) und die Behandlung mit NSAID, eine meist als unerwünschte Nebenwirkung einer medikamentösen Behandlung auftretende akute interstitielle Nephritis sowie die rapid-progressive Glomerulonephritis^{4;10}. Insbesondere bei Kleinkindern kann es zu vaskulär verursachtem akuten Nierenversagen bei der Blockade des Blutflusses z. B. durch Umbilikkatheter kommen¹⁰.

Inzidenzen werden in der Literatur angegeben mit 0,8 Fällen pro 100.000 Kindern und Jahr allgemein, 3,9 Fällen pro tausend Lebendgeburten bei Neugeborenen und 34,5 pro tausend Neugeborenen, die auf eine Neugeborenen-Intensivstation (*neonatal intensive care unit*, NICU) aufgenommen werden mussten⁴.

Verschiedene Studien weisen auf ein erhöhtes Risiko bei unterschiedlichen genetischen Polymorphismen hin, z. B. für Tumornekrosefaktor α (TNF- α)⁴. Unter anderem kam es bei VLBW-Neugeborenen häufiger zu akutem Nierenversagen, wenn die genetische Variation (1267)GG für Hitzeschockprotein 72 (Hsp72) vorlag (ausführlicher ausgeführt im Abschnitt 1.1.5)^{4;23;52}. Genetische Low-Producer für Hsp72 könnten ein erhöhtes Risiko für ein akutes Nierenversagen haben^{4;31}.

Diagnose Wie beim Erwachsenen gibt es bei pädiatrischen Patienten keine allgemeingültige Definition des akuten Nierenversagens, mit der pRIFLE-Klassifikation wird versucht, einen einheitlichen Standard zu schaffen^{4;10}. Allerdings spielen bei praktisch allen Definitionen der Anstieg des Serumkreatininspiegels und die Kreatinin-clearance die herausragenden Rollen. Untersucht auf ihre Tauglichkeit als Biomarker werden wie beim Erwachsenen unter anderem *Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin* (NGAL), Cystatin C, Interleukin 18 und das *Kidney Injury Molecule 1* (KIM-1).

Bei Kindern beinhaltet die vermutlich am weitesten verbreitete Definition des akuten

Nierenversagens einen Anstieg des Serumkreatinins ausgehend vom Ursprungswert um mindestens die Hälfte und einen Anstieg des Serumharnstoffs, gemeinsam mit einer Abnahme der Urinproduktion auf weniger als 0,5- 1,0 ml/kg/h¹⁰. Diese Definition des akuten Nierenversagens wird auch für die Einschlusskriterien der HSP-Studie angewendet.

Prävention Während in Entwicklungsländern Volumenmangel die häufigste – und damit grundsätzlich vermeidbare – Ursache eines akuten Nierenversagens ist, sind die Fälle in Industrienationen aufgrund ihrer komplexeren Ursachen schwerer zu vermeiden⁴. Bei asphyktischen Neugeborenen könnte innerhalb der ersten vier Stunden nach der Geburt gegebenes Theophyllin das Risiko eines akuten Nierenversagens reduzieren, wobei ein Effekt der durch Theophyllin vermittelten Blockade des Vasokonstriktors Adenosin vermutet wird⁴.

Therapie Neben der supportiven Therapie spielt ebenso wie beim Erwachsenen die Nierenersatztherapie durch Hämodialyse oder Hämofiltration die Hauptrolle¹⁰. Auch bei Kindern erscheint die Gabe von Dopamin »in Nierendosis« (0,5 µg/kg - 5 µg/kg pro Minute) obsolet, da sie zwar die Urinmenge erhöht, in Studien aber weder weniger dialysepflichtige Patienten noch verbesserte Überlebenszeiten bei einem akuten Nierenversagen nachgewiesen werden konnten^{4;10}. Im Gegensatz dazu gibt es zumindest hoffnungsvolle Ergebnisse einer Studie mit dem selektiven Dopamin-1-Rezeptoragonisten Fenoldopam, bei der die Zahl der akuten Nierenversagen und der Nierenersatztherapiebedarf ebenso gesenkt werden konnten wie die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation und die Zahl der Todesfälle⁴. Die oben angesprochenen möglichen positiven Effekte von Furosemid bei der Behandlung eines akuten Nierenversagens gelten bei pädiatrischen Patienten wegen der potentiellen ototoxischen Effekte des Furosemids nur eingeschränkt⁴. Besondere Aufmerksamkeit sollte wie bei Erwachsenen der ausreichenden parenteralen oder enteralen Ernährung der Patienten gelten¹⁰.

Prognose Das Mortalitätsrisiko ist bei einem akuten Nierenversagen vor dem Hintergrund eines systemischen Multiorganversagens deutlich höher als beim durch zunächst begrenzte internistische Erkrankungen wie hämolytisch-urämisches Syndrom, rapid-progressive Glomerulonephritis oder akutes interstitielles Nierenversagen nach Medikamentengabe ausgelösten akuten Nierenversagen⁴. Es gibt Hinweise, dass ein akutes Nierenversagen im Kindesalter zu fortschreitendem chronischen Nierenversagen im Erwachsenenalter prädisponiert³⁴. Entgegen früherer Annahmen, dass ein akutes Nierenversagen mit der Rückkehr zur normalen Nierenfunktion überstanden sei, gibt es Hinweise, dass die Erholung nur unvollständig sein könnte und das Risiko für eine chronische Nierenerkrankung langfristig erhöht sein könnte⁴. Besonders gefährdet für die Langzeitfolgen sind Kinder mit einer Nierenerkrankung wie hämolytisch-urämisches Syndrom oder rapid-progressive Glomerulonephritis⁴. Vor diesem Hintergrund müssen Kinder nach einem akuten Nierenversagen langfristig beobachtet werden⁴.

1.1.3 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine wurden 1962 von Ferruccio Ritossa in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt⁴⁵. Sie werden bei unspezifischem Stress vermehrt produziert. Die Produktion von nur sechs Hitzeschockproteinen kann bei Zellstress bis zu einem Drittel der neusynthetisierten Proteine in der Zelle ausmachen, was auf die große Bedeutung der Hitzeschockproteine beim Zellstress hinweist¹⁷. Die Hitzeschockproteine sind hochkonservierte zelluläre Schutzproteine, mehr als 80 % des genetischen Codes von Hsp70 sind bei Eukaryoten und Bakterien identisch⁶.

Hitzeschockproteine sind so genannte Chaperone, zytoprotektive Proteine die bei der Proteinentstehung stabilisierend wirken, Proteine an ihr intrazelluläres Ziel leiten und die Aggregation von Proteinen verhindern¹⁷. Zudem können sie bei Zellstress, z. B. durch Hypoxie oder Ischämie, beschädigte Proteine reparieren, Fremdproteine degradieren, die stressinduzierte Apoptose verhindern helfen, das Zytoskelett stabilisieren und DNA-Schäden reparieren¹⁷. Hitzeschockproteine kommen in Nierenzellen vor und können bei einem ischämischen Zellschaden die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle deutlich erhöhen¹⁷.

Die Hitzeschockproteine werden entsprechend ihres Molekulargewichtes in Kilodalton (kDa) in Klassen eingeteilt: Hsp20-30 kDa, Hsp50-60 kDa, Hsp70 kDa (Hitzeschockproteine zwischen 68 kDa und 78 kDa), Hsp90 kDa und Hsp100-110 kDa. Es gibt konstitutive und stressinduzierte Hitzeschockproteine; das in dieser Arbeit untersuchte Hsp72 ist die induzierbare Form der Hsp70⁶. Die Bedeutung der Hsp70 für die Zelle wird unterstrichen durch die Tatsache, das Hsp70-Knockout-Tiere nicht überlebensfähig sind⁶.

Chaperone spielen vor allem in der Niere eine entscheidende Rolle, da das Nierengewebe wegen der hohen Sauerstoffextraktionsrate, die für die Konzentrierung des Urins notwendig ist, regelmäßig an der Grenze zur Hypoxie arbeitet¹⁷. Ihre Aufgabe erfüllen die Chaperone, indem sie Proteinvorläuferpeptide falten und stabilisieren, die korrekte Faltung überwachen, Peptide über Membranen transportieren und bei der Zusammensetzung von Proteinkomplexen unterstützen¹⁷. Sie fungieren quasi als Qualitätskontrollproteine im Zytosol.

Bei Zellstress kommt es zu Synthesefehlern und Fehlfaltungen bei der Produktion von Proteinen. Chaperone versuchen in diesem Fall, die Proteine erneut zu falten bzw. die Proteine zu reparieren oder der Degradierung zuzuführen^{6;17}. Während Chaperone im Zytosol die Apoptose verhindern helfen können, lösen sie bei der Expression auf der Zelloberfläche eine Immunantwort aus, die zum Zelltod führt¹⁷. Hitzeschockproteine sind regelmäßig auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen zu finden.

1.1.4 Hsp72

Die Produktion von Chaperonen wird durch hunderte verschiedene, unspezifische Formen des Zellstress ausgelöst, darunter Hitzeschock, ATP-Mangel, Ischämie und Infektion^{6;17}. Das am besten untersuchte Hitzeschockprotein ist Hsp72¹⁷. Zu den Aufgaben von Hsp70 (induzierbares Hsp72 und konstitutives Hsp73) im Zytosol gehören die Neufaltung beschädigter Proteine, das Verhindern der Proteinaggregation, die Organisation der Proteinde-

gradierung, das Ersetzen beschädigter Proteine in Zellorganellen, die Stabilisierung des Aktinzytoskeletts, die Stabilisierung von Zentrosomen und Mikrotubuli, das Wiederherstellen der Zellpolarität, die Regulation von Proteinkinasen, die Übernahme zytokinähnlicher Aufgaben, die Regulierung des Zellzyklus und die Kontrolle der Entzündungsreaktion¹⁷. Denaturieren intrazelluläre Proteine, wird die Synthese von Hsp72 induziert¹⁷. In der Folge versucht Hsp72, beschädigte Proteine entweder neu zu falten oder führt sie den Lysosomen oder der ubiquitinvermittelten Proteolyse zu, wodurch die Proteine degradiert werden^{6;17}.

Bei einer Vielzahl von Nierenerkrankungen konnte die erhöhte Produktion von Chaperonen in den Nierenzellen nachgewiesen werden¹⁷. All diese Erkrankungen (Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Ischämie und Hypoxie, Toxinschäden) können ein akutes Nierenversagen auslösen. Bei der Reparatur nach einer ischämischen Verletzung spielt Hsp72 eine Rolle: Stunden nach einer renalen Ischämie wird – wie in praktisch allen Säugerzellen – vermehrt Hsp72 exprimiert^{6;17}. Besonders hoch ist die Hsp72-Expression in der inneren Medulla der Niere, die am wenigsten von ischämischen Schäden betroffen ist¹⁷. Der wichtigste Transkriptionsfaktor für Hsp72 ist dabei *Heat Shock Transcription Factor 1* (HSF-1)¹⁷. Für die Funktion von Hsp72 sind Co-Chaperone notwendig, zu denen Hsp40, BAG-1, Hip-Hop und andere gehören¹⁷.

Hsp72 besitzt drei funktionale Domänen: Eine c-terminale Peptiderkennungs- und Peptidbindungsstelle, eine kurze Verbindungssequenz und eine n-terminale ATPase-Domäne¹⁷. Die ATPase-Domäne bindet und stabilisiert vermutlich Aktin¹⁷. Hsp72 bindet an die hydrophoben Bindungsstellen beschädigter Proteine⁷. Eine erhöhte Hsp72-Konzentration ist zudem assoziiert mit einer verbesserten Dichte der Tight Junctions der Zelle¹⁷. Über die Interaktion mit c-Src könnte Hsp72 zudem die Zell-Zell-Kontakte weiter stabilisieren¹⁷. Auch bei der Wiederherstellung der Zellpolarität spielt Hsp72 eine Rolle, indem es den Wiederaufbau der Na⁺-K⁺-ATPase in die basolaterale Membran bewirkt¹⁷.

Hsp72 hindert die Jun-N-terminale-Kinase (JNK) daran, die Apoptose in Zellen auszulösen¹⁷. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Blockade der Proteasomen gezeigt werden¹⁷. Hsp72 wird zudem benötigt, um apoptotische Proteasen (Procaspasen 9 und 3) zu inhibieren¹⁷. In-vitro konnte auch gezeigt werden, dass Hsp70 die Aktivierung des Apoptosoms (Cytochrom c, Apoptoseaktivierender Faktor und Procaspase 9) blockiert¹⁷. Hsp72 könnte so mit über das Überleben oder den Untergang ischämisch geschädigter Zellen entscheiden¹⁷. Während hohe Hsp72-Spiegel in der Zelle oder im Zellkern zytoprotektiv wirken, stellt die Expression von Hsp70 auf der Zelloberfläche einen Marker für die Zellzerstörung durch das Immunsystem dar¹⁷.

Versuche, in situ die Resistenz gegenüber einem ischämischen Schaden bei intakten Rattennieren durch das Hochregulieren der Hsp72-Expression zu erhöhen, sind bislang nicht erfolgreich bzw. inkonsistent gewesen^{17;29}. Der Hydroxylaminabkömmling Bimocloamol erhöht die HSP-Expression bei Mäusen und schützt diese gegen ischämische Schäden¹⁷.

Eine Vielzahl von Arbeiten gibt Hinweise darauf, dass HSP und insbesondere Hsp72 eine herausragende Rolle bei der Stabilisierung eines akuten Nierenversagens spielen. Die stressinduzierte Freisetzung bzw. Überexprimierung von Hsp70 in Nierenepithelzellen kann in vitro die Apoptoserate verringern⁶. Hsp70 blockiert in vitro die stressinduzierte Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und die Freisetzung von apoptoseinduzierendem Fak-

tor⁶. HSP wirken beim Wiederherstellen der Zellpolarität mit: der erhöhte Anfall von HSP im Zytosol fällt zeitlich mit der Restrukturierung und Wiederherstellung zerstörter Proteine in proximalen Tubuluszellen nach Ischämie zusammen⁶. Hsp70 repariert die Zellstruktur des proximalen Tubulus nach einem renalen Ischämieschaden im Ratten-Tiermodell¹⁴. Gemeinsam mit Hsp25 und Hsp90 stabilisiert Hsp70 die Na⁺-K⁺-ATPase im ischämischen renalen Rattenkortex¹⁵. Wird die Hsp70-Exprimierung genetisch blockiert, nimmt das Zytoskelett bei einem ischämischen Insult größeren Schaden⁶.

1.1.5 Hintergründe

Thermal induzierter Schutz vor Nierenversagen ist HSP-abhängig Kelly et al. überprüften 2001³¹, ob die Induktion von HSP einen protektiven Effekt auf ein experimentelles akutes Nierenversagen im Ratten-Tiermodell hat. Sie konnten nach achtminütiger Hyperthermie vermehrt mRNA für Hsp84, Hsp70 und Hsp22 nachweisen, nicht aber nach vierminütiger Hyperthermie. Ebenso waren die Rattennieren nach achtminütiger Hyperthermie sechs Stunden vor der Ischämie besser vor postischämischen Schäden geschützt. Blockierten sie die Induktion von Hsp84 und Hsp70 mit Quercetin, so fehlte der Schutz.³¹

Hypertherme Konditionierung verbessert Ischämietoleranz Redaelli et al. untersuchten 2002⁴⁴ an Rattennieren die Wirkung einer hyperthermen Präkonditionierung auf das Entstehen ischämischer Schäden bei kalter Ischämie, im Rahmen möglicher protektiver Effekte der HSP bei Nierentransplantationen. Nach 32-stündiger kalter Ischämie bei 4 °C reduzierte die hypertherme Präkonditionierung deutlich die funktionalen Schäden an den Nieren. Während bei einer 40-stündigen kalten Ischämie Tiere, die nicht hitzeschockpräkonditionierte Nieren transplantiert bekamen, verstarben, überlebten jene Tiere, die präkonditionierte Nieren erhalten hatten. Redaelli et al. schließen, dass die Induktion von Hsp72 und Hsp32 die Überlebensrate nach Transplantation steigern könnte.⁴⁴

Ischämische Konditionierung schützt das Zytoskelett Aufricht et al. konnten 2002⁷ in vivo nachweisen, dass die ischämische Präkonditionierung die Dissoziation der Na⁺-K⁺-ATPase aus dem Zytoskelett beim akuten Nierenversagen im Ratten-Tiermodell verhindert. Dazu verglichen sie den Effekt einer einmaligen Ischämie mit mehrfach durchgeführten ischämischen Insulten. Nach mehrfacher Ischämie konnten Aufricht et al. nicht mehr Na⁺-K⁺-ATPase extrahieren als nach einmaliger Ischämie. Der Schutzeffekt ließ sich in vitro aufheben, wenn Antikörper gegen Hsp25 oder Hsp70 zugefügt wurden. Daher führen die Autoren den Effekt auf die Konditionierung im Sinne der gesteigerten Induktion von Hsp25 und Hsp70 zurück.⁷

Hsp72 als Schutz unreifer Nieren vor ischämischen Schäden Vicencio et al. überprüften 2002⁵³ die Rolle von Hsp72 für die Ischämietoleranz der unreifen Niere Neugeborener. Bereits zuvor war belegt worden, dass Tubuli unreifer Ratten eine stärkere Stressantwort zeigen als reife Tubuli. Bekannt ist zudem, dass unreife Nieren gegenüber ischämischem

bzw. anoxischem Stress weniger anfällig sind als reife Nieren. In ihrer Studie untersuchten Vicencio et al. bei Ratten die Hsp72-Expression in der Niere und überprüften, ob die Expression mit der Stressresistenz korrelierte. Die Hsp72-Produktion stieg bis zum zehnten Tag nach Geburt an und fiel anschließend ab. Am ausgeprägtesten war das Hsp72-Vorkommen in tubulären Segmenten, wo Ischämieschäden sich hauptsächlich niederschlagen.⁵³

Zusätzlich setzten Vicencio et al. unreife und reife Rattennieren einer 45-minütigen Ischämie aus. Die postischämische Hsp72-Induktion in unreifen Rattennieren war ausgeprägter als bei reifen Rattennieren, mit einem Gipfel zwei Stunden nach der Ischämie. Aus ihren Ergebnissen schließen die Autoren, dass die deutliche Hsp72-Expression für den Schutz der immaturren Rattenniere vor anoxischen Schäden verantwortlich sein könnte⁵³.

Hsp70 inhibiert NF κ B-vermittelte Entzündung beim akuten Nierenversagen Jo et al. wiesen 2006²⁸ nach, dass Hsp70 die Entzündungsreaktion beim ischämischen akuten Nierenversagen bei Ratten durch eine Blockade von nukleärem Faktor κ -B (NF κ B) mindern kann. Durch eine Hitze-Präkonditionierung kann das Ausmaß einer NF- κ -B-induzierten Entzündungsreaktion vermindert werden. Jo et al. zeigen, dass vermutlich vor allem Hsp70 für diesen Schutzmechanismus verantwortlich gemacht werden können: Werden Hsp70 durch Quercetin inhibiert, lässt sich der Präkonditionierungsschutz nicht mehr reproduzieren.²⁸

Hsp72 im Urin nach Ischämie Müller et al. konnten 2003³⁷ zeigen, dass Hsp72 bei pädiatrischen Patienten (Durchschnittsalter sechs Jahre) nach einem ischämischen Schaden der Niere im Urin nachweisbar ist. Zu diesem Zweck untersuchten sie die ersten Urinproben von sechs nierentransplantierten pädiatrischen Patienten. In diesen innerhalb von zwölf Stunden nach der Transplantation gesammelten Proben konnten sie Hsp72 mittels Western Blot nachweisen. In Proben von drei gesunden Probanden, drei stabil transplantierten Nierenempfängern und drei nierenkranken nichttransplantierten Patienten war dagegen kein Hsp72 nachweisbar.

In parallel durchgeführten Experimenten an Ratten gelang es Müller et al. in der gleichen Studie³⁷ bei einer künstlich herbeigeführten 45-minütigen renalen Ischämie ebenfalls, im 24 Stunden später durch Blasenpunktion gewonnenen Urin Hsp72 nachzuweisen. Wurden die Rattennieren in vivo dagegen bei 40°C einer einstündigen Hyperthermie ausgesetzt, war im 24 Stunden später gewonnenen Urin kein Hsp72 nachweisbar.

Sowohl nach Hyperthermie als auch nach künstlich herbeigeführter Ischämie war im renalen Kortex der Ratten Hsp72 nachweisbar, wogegen bei Kontrollratten kein Hsp72 im renalen Kortex nachweisbar war. Die Hsp72-Expression wird also durch beide Reize angeregt, allerdings wird Hsp72 möglicherweise nur nach einem ischämischen renalen Schaden in den Urin abgegeben.

In der gleichen Arbeit gelang es Müller et al. nicht, Hsp72 im Urin unspezifisch proteinurischer nierenkranker pädiatrischer Patienten nachzuweisen. Dieser Umstand könnte darauf hinweisen, schreiben die Autoren selbst, dass im Urin nachweisbares Hsp72 kein

unspezifischer Marker für eine Nierenschädigung ist, sondern spezifisch den ischämischen Zellschaden anzeigt.

Müller et al. gehören mit ihrer Arbeit zu den ersten, die Hsp72 nicht nur im experimentellen Setting nachweisen, sondern Hsp72 auch in klinischen Proben nachweisen können. Ihre Ergebnisse gelten zunächst nur für nierentransplantierte pädiatrische Patienten. Der positive Nachweis von Hsp72 im Urin nach einem ischämischen Schaden in Verbindung mit dem fehlenden Nachweis bei nicht-ischämischen Kontrollen bestätigt aus Sicht von Müller et al. die Notwendigkeit des Verlusts der tubulären Zellintegrität, um Hsp72 im Urin nachweisen zu können.³⁷

Extrazelluläres Hsp70 bei Kindern mit septischem Schock Wheeler et al. überprüften 2005⁵⁵ erstmals, ob Hsp70 im Plasma von Kindern mit septischem Schock erhöht ist. Bei 94 Kindern mit septischem Schock und 24 Kindern in der Kontrollgruppe (elektive chirurgische Eingriffe) maßen sie Hsp70 in venösen oder arteriellen Blutproben, die innerhalb von 24 Stunden nach der Aufnahme auf eine pädiatrische Intensivstation bzw. während einer präoperativen Visite (Kontrollgruppe) abgenommen wurden. Die Hsp70-Konzentration wurde mit Hilfe von Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) bestimmt.

Die Menge an Hsp70 im Serum war bei den Kindern im septischen Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (52,6 ng/ml gegenüber 8,1 ng/ml). Die Autoren schließen daraus, dass auch extrazelluläres Hsp70 eine Rolle bei der Verarbeitung eines septischen Schocks spielt.⁵⁵

Low-Producer-Status für Hsp72 und akutes Nierenversagen Fekete et al. gelang es 2003²³, eine Verbindung zwischen einem molekulargenetischen Low-Producer-Polymorphismus für Hsp72 und dem akuten Nierenversagen bei Frühgeborenen herzustellen.

Polymorphismen in der Hsp70-Familie konnten mit einer Vielzahl relevanter Erkrankungen assoziiert werden. Insbesondere Autoimmunerkrankungen (z. B. Asthma, M. Basedow, Diabetes mellitus Typ I, systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis, Sarkoidose)²¹, kardiovaskuläre Erkrankungen (z. B. Schlaganfall, Myokardinfarkt)^{16;59} und nephrologische Erkrankungen (akutes Nierenversagen, Harnwegsinfekte)^{23;30;39;52;53} zeigen signifikante Assoziationen mit genetischen Varianten der Hitzeschockproteine.

In der HSP-Studie wird eine spezifische Mutation untersucht, der Austausch eines Adenin gegen einen Guanin-Rest an Position 1267 des Hsp72-Gens.¹ Diese Mutation führt zu keiner strukturellen Veränderung der Aminosäuresequenz und wird deshalb als »silent mutation« bezeichnet. Die Unterschiede in der Basensequenz können jedoch zu Veränderungen in der Stabilität des translationalen mRNA-Produkts, des Splicing-Ergebnisses und der transkriptionalen Kontrolle und damit der Expressionshäufigkeit führen.

Die Verteilung der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung beträgt etwa 40 % (1267)AA (Wildtyp), 50 % (1267)AG (Heterozygotie) und 10 % (1267)GG (Homozygotie). In ausge-

¹In einigen Arbeiten zu diesem Thema wird die Bezeichnung Hsp70-2 verwendet, um es vom Hsp70-1-Gen unterscheiden zu können. Hsp70-1 kodiert für das identische Proteinprodukt, unterliegt aber individueller Regulation.

wählten Risikopopulationen ist die Häufigkeit des (1267)GG-Allels erhöht. Das signifikant häufigere Auftreten dieses Allels bei Frühgeborenen könnte das Risiko für intrauterine Infektionen erhöhen²³.

1.2 Fragestellung

Auf dem Boden der zum Zeitpunkt der Planungen für die HSP-Studie im Sommer 2005 bekannten Informationen zur Rolle von Hitzeschockproteinen für die Bewältigung ischämischer Schäden beim akuten Nierenversagen ergibt sich die Fragestellung, die in der HSP-Studie untersucht wird: Gibt es eine Korrelation zwischen dem Anfall von Hsp72 im Urin von Kindern mit dem Eintreten eines akuten Nierenversagens und dessen klinischen Verlauf bei schwer kranken pädiatrischen Patienten?

Um diese Frage zu beantworten, wurde vom Autor der vorliegenden Arbeit gemeinsam mit Dr. Judith Glöckner-Pagel und Dr. Karl Reiter die »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)« entworfen. Die HSP-Studie wird in Kapitel 2 vorgestellt.

2 Studie

HSP-Studie Zur Beantwortung der in 1.2 dargelegten Fragestellung konzipierten Dr. Judith Glöckner, Dr. Karl Reiter und der Autor im Sommer 2005 die »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)«.

Statistik Statistisch beraten wurden die Studienautoren während der Planung vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. Ulrich Mansmann) und Dr. Philipp Pagel vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München (Vorstand Prof. Dr. Hans-Werner Mewes). Bei der Auswertung der Studie beriet Dr. Philipp Pagel den Autor.

Registrierung Die HSP-Studie wurde international üblichen wissenschaftlichen Anforderungen entsprechend beim Internetportal des US-Gesundheitsministeriums, ClinicalTrials.gov³⁸, registriert. Sie trägt dort die Registrierungsnummer HSP-233-05 (*Unique Protocol ID*) und den englischsprachigen Titel *Study of Heat Shock Proteins as Prognostic Factor of Acute Renal Failure in Children (HSP-Study)*. Die Registrierungsdaten werden vom Autor entsprechend der Vorgaben von ClinicalTrials.gov halbjährlich aktualisiert und sind für jedermann einsehbar.

Ethikvotum Mit Datum vom 24.8.2005 beantragten Dr. Judith Glöckner-Pagel und Dr. Karl Reiter bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München die Beurteilung der »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)«. Mit Datum vom 19.9.2005 bestätigte die Ethikkommission die Zuerkennung der ethisch-rechtlichen Unbedenklichkeit, insofern die Patienteninformation in drei Punkten überarbeitet werde, was zum 28.9.2005 erfolgt ist. Laut Schreiben der Ethikkommission erhebt diese keine grundsätzlichen ethisch-rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie. Die HSP-Studie trägt bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München die Projektnummer 233-05. Der vollständige Ethikantrag ist im Anhang unter 6.2 enthalten.

2.1 Studiendesign

Im Folgenden werden die wichtigsten Daten des Studiendesigns in seiner revidierten Fassung vom 28.9.2005 wiedergegeben. Das vollständige Studiendesign ist im Anhang unter 6.1 enthalten.

Studieninformation Die HSP-Studie ist eine Studie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München, die von der Arbeitsgruppe Glöckner im Forschungszentrum Kubus durchgeführt wird. Studienleiter und Prüffärzte sind Dr. Judith Glöckner-Pagel und Dr. Karl Reiter. An der Studie beteiligt ist der Autor dieser Arbeit in seiner Eigenschaft als medizinischer Doktorand und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Glöckner, sowie das technische Assistenzpersonal der Arbeitsgruppe Glöckner im Forschungskubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals.

Für die Auswertung der Studie war die Beteiligung des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgesehen. Die Auswertung wurde aus organisatorischen Gründen stattdessen mit Hilfe von Dr. Philipp Pagel vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München durchgeführt.

2.1.1 Studienpopulation

Untersucht werden neugeborene und pädiatrische Patienten bis zum Alter von 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie, definiert jeweils nach den Einschlusskriterien der HSP-Studie, wie im Abschnitt 2.1.4 und Tabelle 3 dargestellt.

2.1.2 Hypothese

Die Produktion von Hitzeschockproteinen hat einen Einfluss auf Entstehung und Ergebnis des akuten Nierenversagens von Kindern.

2.1.3 Nullhypothese

Die Produktion von Hitzeschockproteinen hat keinen Einfluss auf Entstehung und Ergebnis des akuten Nierenversagens von Kindern.

2.1.4 Design

Studienart Die Studie ist eine Beobachtungsstudie, die als Fall-Kontroll-Studie einen »*Proof of Principle*« erbringen soll.

Studiengruppen Die Patienten werden in die Fallgruppe »Entwicklung eines akuten Nierenversagens« und die Kontrollgruppe »Nichtentwicklung eines akuten Nierenversagens« aufgeteilt.

Einschlusskriterien Einschlusskriterien sind Alter bis zu 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie. Sepsis und Schock werden anhand internationaler Konsensuskriterien²⁶ definiert. Das ANV wird als Serumkreatininanstieg (Verdoppelung gegenüber dem Ausgangswert) und eine Abnahme des Urinvolumens unterhalb von 0,5 ml/kg KG/h oder eine um mindestens 50 % reduzierte Kreatininclearance definiert. Die Beobachtung beginnt mit der Aufnahme der Patienten auf die Intensivstation.

Ausschlusskriterien Ausschlusskriterien sind eine vorbestehende Nierenerkrankung oder Nierentransplantation. Das fehlende Einverständnis der Eltern oder eines gesetzlichen Betreuers gilt ebenfalls als Ausschlusskriterium.

Endpunkte Endpunkte der Studie sind die Entwicklung eines akuten Nierenversagens, die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens nach akutem Nierenversagen und Mortalität.

Fallzahl Es sollen aus den Altersgruppen bis ein Jahr, ein bis sechs Jahre und sechs bis 18 Jahre jeweils mindestens 20 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die ein akutes Nierenversagen entwickeln. Die statistisch benötigte Fallzahl wird vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München berechnet.¹

Patientenrekrutierung Patienten sollen im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, der Kinderklinik Dritter Orden München-Nymphenburg, der Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching, der Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg und der Kinderklinik Memmingen rekrutiert werden.²

Dokumentation Die Daten aller in die Studie eingeschlossenen Patienten werden in einer Datenbank gesammelt. Darin enthalten sind die Routineparameter der klinischen Überwachung auf der Intensivstation aus den Krankenakten der Patienten, sowie die Ergebnisse der für die Studie durchgeführten Untersuchungen. Die Daten werden sofort im Anschluss an die Behandlung des Kindes in die Datenbank eingegeben und zu diesem Zeitpunkt auf Vollständigkeit überprüft. Die Auswertung der Daten erfolgt nach Abschluss der Rekrutierung am Ende der Studie. Alle außergewöhnlichen Ergebnisse und Ereignisse werden in der Datenbank notiert und kommentiert.

¹Eine formalisierte Berechnung seitens des IBE hat aus organisatorischen Gründen nicht stattgefunden.

²An der Studie teilgenommen haben: Dr. von Haunersches Kinderspital (München), Kinderklinik Memmingen (Memmingen), Klinikum Augsburg – II. Klinik für Kinder und Jugendliche (Augsburg), Deutsches Herzzentrum München (München), Klinikum der Barmherzigen Brüder St. Hedwig (Regensburg), Kinderklinik Rosenheim (Rosenheim).

Diagnose	Kriterien
ANV	Serumkreatininverdoppelung gegenüber Ausgangswert und Abnahme des Urinvolumens unter $0,5 \text{ ml/kg KG/h}$ oder Kreatininclearance um mindestens 50 % reduziert
Sepsis	SIRS bei bestehender oder als Ergebnis einer angenommenen oder bewiesenen Infektion
SIRS	Zwei von vier der folgenden Kriterien sind erfüllt, eines muss abnorme Temperatur oder Leukozytenzahl sein: – Körperkerntemperatur $> 38,5^\circ\text{C}$ oder $< 36,0^\circ\text{C}$ – Tachykardie (mittlere Herzfrequenz > 2 SD über Altersnorm) – Mittlere Atemfrequenz > 2 SD über Altersnorm oder maschinelle Beatmung – Leukozytenzahl erhöht oder erniedrigt gegenüber Altersnorm oder $> 10\%$ unreife Neutrophile
Schock	Kardiovaskuläre Organdysfunktion: Trotz intravenöser Gabe eines isotonischen Flüssigkeitsbolus von $\geq 40 \text{ ml/kg}$ in einer Stunde – Hypotension unter der fünften altersadaptierten Perzentile oder systolisch < 2 SD unter Altersnorm – Vasoaktive Substanzen benötigt (Dopamin $> 5 \mu\text{g/kg/min}$ oder Dobutamin, Adrenalin oder Noradrenalin) oder zwei der fünf folgenden Kriterien sind erfüllt: – Basendefizit $> 5,0 \text{ mEq/l}$ – arterielle Laktatwerte mehr als doppelter Normwert – Urinmenge $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ – verlängerte Kapillarfüllungszeit > 5 Sekunden – Temperaturunterschied Körperkern/-hülle $> 3^\circ\text{C}$
Asphyxie	Atemstillstand nach Geburt

Tabelle 3: Einschlusskriterien für die HSP-Studie, Kriterien für Sepsis, SIRS und Schock modifiziert nach Goldstein et al²⁶. SIRS = *Systemic Inflammatory Response Syndrom*. SD = Standardabweichung.

Ausscheiden aus der Studie Patienten scheiden nur dann aus der Studie aus, wenn sie oder ihre Eltern oder ihr gesetzlicher Betreuer die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie widerrufen.

Follow Up Die Patienten werden beobachtet, bis sie entweder von der Intensivstation auf eine Normalstation verlegt werden oder verstorben sind. Beide Ergebnisse werden in der Datenbank notiert.

Datensammlung und -auswertung Die Daten werden fortlaufend gesammelt und direkt nach dem Eingang vom Studienpersonal in der Datenbank archiviert. Die Auswertung erfolgt unter Mitarbeit des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München.³

2.1.5 Untersuchungen

Probengewinnung Der Urin wird aus dem 24-Stunden-Sammelurin gewonnen, der bei den durchgehend intensivstationspflichtigen Patienten ohnehin gesammelt wird. Die Blutproben werden gemeinsam mit den routinemäßigen Blutproben bei der Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation bzw. bei der ersten routinemäßigen Blutprobe auf der Intensivstation mit abgenommen. Das Blutplasma für die Bestimmung des Hsp72-Spiegels im Plasma wird gemeinsam mit der ersten routinemäßigen Blutentnahme innerhalb der ersten 24 Stunden nach Erkrankungsbeginn abgenommen. Die 2 ml EDTA-Blut (0,5 ml bei Säuglingen) zur molekulargenetischen Untersuchung des Producer-Status werden mit der nächsten routinemäßigen Blutprobe vor der eventuellen Gabe eines Erythrozytenkonzentrates abgenommen.

Blut

Qualitative und quantitative Bestimmungen Das vom Patienten entnommene Blut wird auf das Vorkommen von Hitzeschockproteinen untersucht. Zusätzlich werden im Blut Routineparameter wie Kreatinin, Albumin, Elektrolyte und Eiweiß im Plasma gemessen, um Anhaltspunkte für die Rahmenbedingungen der Blutentnahme gewinnen zu können.

Molekulargenetische Untersuchungen Diagnostisch untersucht wird der genetische Producer-Status der Studienpatienten für die Hitzeschockproteine, hier insbesondere Hsp72. Aus den aus dem entnommenen Blut gewonnenen Zellen wird das Genom des Patienten auf den Polymorphismus für die Produktion des Hsp72, also den eventuellen Low-Producer-Status für Hsp72, untersucht.

³Abweichend von dieser Absicht erfolgte die Auswertung aus organisatorischen Gründen unter Mitarbeit von Dr. Philipp Pagel vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München.

Urin

Der vom Patienten gewonnene Urin wird auf das Vorkommen von Hsp72 untersucht. Zusätzlich werden auch hier Routineparameter bestimmt.

2.1.6 Statistik

Fallzahlberechnung Die Studienleitung rechnet mit einer minimalen Fallzahl von 60 Patienten mit entwickeltem akuten Nierenversagen.⁴

Ende der Studie Die Studie endet nach Erreichen der notwendigen Fallzahl oder vier Jahre nach Studienbeginn, falls absehbar ist, dass die notwendige Fallzahl nicht innerhalb des fünften Studienjahres erreicht werden kann.⁵

Datenüberprüfung Die Überprüfung der Daten obliegt der Studienleitung.⁶

Datenbereinigung Eine Datenbereinigung findet nach der Überprüfung der Daten statt, um die Daten statistisch auswerten zu können.

Einschluss in die Auswertung Alle erhobenen Daten werden ausgewertet.

2.1.7 Weitere Regelungen

Qualitätskontrolle Die Studienleitung überprüft und dokumentiert halbjährlich die korrekte Durchführung der Untersuchungen, der unverzüglichen Datenspeicherung, der Einhaltung der gesetzlichen und ethischen Normen und der Aktualisierung der Studieninformationen im Internetportal ClinicalTrials.gov.

Publikation Nach dem Ende der Studie werden die Ergebnisse in einer medizinischen Fachzeitschrift veröffentlicht. Die Veröffentlichung der hier vorliegenden Dissertation des an der Studie beteiligten Autors dieser Arbeit ist ebenfalls im Studiendesign der HSP-Studie als geplante Publikation angegeben.

Datenschutz Im Rahmen der HSP-Studie wurden umfangreiche Vorkehrungen für den Datenschutz getroffen. Die Details sind im Abschnitt 6.1 wiedergegeben.

⁴Das Studiendesign geht an dieser Stelle von einer Fallzahlberechnung durch das IBE aus, die aus organisatorischen Gründen und wegen fehlender Parameter nicht formell stattgefunden hat.

⁵Abweichend von dieser Planung ist die Studie im fünften Jahr noch für weitere Probanden offen, d. h. es können weiterhin Probanden rekrutiert werden.

⁶Das Studiendesign nennt an dieser Stelle neben der Studienleitung das IBE als für die Datenüberprüfung zuständig. Aus organisatorischen Gründen ist das IBE nicht an der Überprüfung oder der Auswertung der Daten beteiligt. Stattdessen ist Dr. Philipp Pagel vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München an der Überprüfung und Auswertung der Studiendaten beteiligt.

Patienteninformation Zum Studiendesign gehört eine Patienteninformation in der von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München akzeptierten Fassung, die eine laienverständliche Darstellung des Studienvorhabens enthält.

Webseite Unter der Adresse <http://www.hsp-studie.de/> [8] sind für jedermann einsehbar eine laienverständliche, eine kindgerechte sowie die vollumfängliche fachliche Information (d. h. Studiendesign, Ethikantrag und Patienteninformation) in deutscher Sprache hinterlegt. Die Webseite enthält zudem eine Grundinformation in englischer Sprache. Nach dem Ende der HSP-Studie wird auf dieser Webseite eine Zusammenfassung der Studienergebnisse veröffentlicht.

3 Material & Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Urin

Entsprechend des Studienprotokolls wurden die Urinproben aus dem 24-Stunden-Sammelurin der Patienten gewonnen. Der Urin wurde von den Intensivpflegekräften am Ende der 24-Stunden-Sammelperiode aus dem gepoolten Urin in ein 10 ml-Urinröhrchen abgefüllt und sofort danach im Stationsgefrierschrank bei -20°C gelagert. Die Urinproben wurden innerhalb der nächsten 48 Stunden vom Studienpersonal übernommen und mit der dem Patienten zugewiesenen Studien-ID versehen. Auf Eis wurden die Urinproben gut durchmischt und anschließend auf mit der jeweiligen ID versehene 0,5 ml-Gefäße aufgeteilt, um für die Analyseversuche nur Aliquotmengen auftauen und einsetzen zu müssen und so die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass die Proteine im Urin durch mehrfaches Auf- und Abtauen denaturieren. Anschließend wurden die Urinproben ohne Unterbrechung der Kühlkette in einem Laborgefrierschrank bei -20°C eingelagert.

3.1.2 Blut

Entsprechend des Studienprotokolls wurden Blutproben gemeinsam mit den routinemäßigen Blutproben bei der Aufnahme der Studienteilnehmer auf die Intensivstation bzw. bei der ersten routinemäßigen Blutprobe auf der Intensivstation abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte durch ärztliches Personal der Intensivstation. Die Blutentnahme erfolgte in für die Blutplasmagewinnung vorgesehene Blutentnahmeröhrchen mit mindestens einem Blutstropfen Inhalt und in EDTA-Blutröhrchen für die molekulargenetische Untersuchung des Hsp72-Producer-Status mit ebenfalls mindestens einem Blutstropfen (ca. $100\ \mu\text{l}$) Inhalt. Die Höchstmenge des abgenommenen Blutes war durch die Röhrchengröße auf maximal 2ml Blut beschränkt. Die Blutröhrchen wurden direkt nach der Abnahme vom ärztlichen Personal der Intensivstation im Stationsgefrierschrank bei -20°C gelagert. Die Blutproben wurden innerhalb der nächsten 48 Stunden vom Studienpersonal übernommen, mit der dem Patienten zugewiesenen Studien-ID versehen und anschließend ohne Unterbrechung der Kühlkette in einem Laborgefrierschrank bei -20°C eingelagert.

3.2 Probenuntersuchung

Urin- und Blutproben wurden in Chargen analysiert.

3.2.1 Gelelektrophorese (SDS-PAGE) & Western-Blot

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis*, SDS-PAGE) und Western Blot sind zwei Analysemethoden, die kombiniert erlauben, die in einer Suspension enthaltenen Proteine zunächst aufzutrennen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern und Chemilumineszenz sichtbar zu machen.⁵¹ Für die HSP-Studie wurden als Proben ausschließlich Urin-Aliquots der Probanden mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließendem Western-Blotting untersucht.

Proteine und damit auch Hsp72 bewegen sich im elektrischen Feld aufgrund ihrer überwiegend negativen Ladung in Richtung der Anode. In einer gelartigen Matrix bewegen sich unterschiedlich große Proteine dabei unterschiedlich schnell, wodurch die Gele sich entsprechend ihres Molekulargewichts der Reihe nach auftrennen lassen. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der an das zu untersuchende Protein (hier ein Anti-Hsp72-Antikörper) bindet und eines zweiten Antikörpers, der wiederum eine Bindungsstelle für ein chemilumineszentes Agens enthält (hier ein Goat-anti-Mouse-Antikörper) ist es möglich, die in einer solchen gelartigen Matrix (das Polyacrylamidgel) aufgetrennten und auf ein Trägermedium (hier Nitrozellulose) übertragenen Proteine auf einer Röntgenaufnahme sichtbar zu machen.

SDS-PAGE

Die Gele für die Gelelektrophorese wurden höchstens 24 Stunden vor der SDS-PAGE selbst gegossen. Tabelle 4 enthält die verwendeten Gele und deren Zusammensetzung. Die selbst gegossenen Gele wurden in Kombination mit dem kommerziell erhältlichen SDS-PAGE-System Mini-Protean 3 (BioRad Laboratories GmbH, München) eingesetzt.

Von jeder Urinprobe wurden $10 \mu\text{l} + 2 \mu\text{l}$ modifizierter Laemmli-Puffer³³ in das Stacking-Gel des SDS-PAGE-Systems eingesetzt. In jedem Gel wurde ein *Precision Plus Protein Standards Dual Color*-Standard (BioRad Laboratories GmbH, München) mitpipettiert, um die detektierten Proteine nach Fertigstellen des Western-Blots der korrekten Proteingröße zuordnen zu können.

Die Rezepte für alle im Rahmen der SDS-PAGE und des Western-Blots verwendeten Puffer sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die SDS-PAGE wurde mit eiskaltem Running Buffer durchgeführt. Das gesamte Elektrophorese-System stand dabei in einem mit Eiswasser umgebenen Isolationsgefäß. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 120V durchgeführt und gestoppt, sobald die blaue Mercaptoethanol-Bande aus dem Elektrophoresegel herausgelaufen war. Anschließend wurden die Gele aus dem System entnommen, das Stacking-Gel abgetrennt und der Transfer der Proteine im Western-Blot begonnen. Technisch bedingt konnten im verwendeten BioRad-System (BioRad Laboratories GmbH, München) pro SDS-PAGE 10 bis maximal 15 Proben untersucht werden.

Western Blot

Die Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) übertragen. Die Membranen wurden, ebenso wie das gesam-

te Blotting-System, für mehrere Minuten mit Transferpuffer gewässert. Geblottet wurde im Mini-Protean Tetra-Cell-System (BioRad Laboratories GmbH, München), das für den Blotting-Vorgang in einem Kühlraum bei 4°C in Eiswasser in einem Isolationsgefäß gelagert und konstant bei 120 V für mindestens 60 Minuten betrieben wurde. Im Anschluss erfolgte der Nachweise des erfolgreichen Proteintransfers durch kurzzeitiges Anfärben mit Ponceau S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), anschließend wurde der Farbstoff mit ddH₂O herausgewaschen. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch einstündiges Blocken mit TBS-Tween + fettfreiem Milchpulver bei Raumtemperatur verhindert.

Die für den Western-Blot verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:20.000 in TBS-Tween + fettfreies Milchpulver, entsprechend den Herstellerangaben) erfolgte in einem Reagenzgefäß (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) auf einer Schüttelwippe im Kühlraum bei 4°C über Nacht (mindestens zwölf Stunden). Die Membranen wurden anschließend mindestens dreimal mit TBS-Tween gewaschen. Mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10.000 in TBS-Tween + fettfreies Milchpulver, entsprechend den Herstellerangaben) wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-Tween gewaschen und anschließend entwickelt.

Für die Entwicklung der Western-Blots in einem manuellen Röntgensystem wurde als Chemilumineszenz Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE, Piscataway, USA) in Verbindung mit Röntgenfilmen Amersham Hyperfilm ECL (GE, Piscataway, USA) eingesetzt. Die gewaschenen Membranen wurden dünn mit einem Chemilumineszenz-Film überdeckt und blasenfrei zwischen zwei Folienblättern fixiert. In der Dunkelkammer wurde anschließend der Röntgenfilm manuell belichtet, die notwendigen Belichtungszeiten wurden pro Blot ermittelt. Die fertigen Western-Blots und die Röntgenfilme wurden anschließend beschriftet und archiviert.

3.2.2 Enzyme Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit Hilfe des Enzyme Linked Immunosorbent-Assay (ELISA) lassen sich Proteine in einer Probe detektieren und quantifizieren. Eingesetzt wurden zwei verschiedene Stress Xpress Hsp70¹ ELISA Kits (EKS-700A bzw. EKS-700B, Stressgen, Ann-Arbor, USA)². Beide Kits waren und sind vom Hersteller nicht explizit für die Detektion von Hsp70 im menschlichen Urin zugelassen.⁴⁹ In Ermangelung eines hierfür freigegebenen ELISA-Kits wurde dieser verfügbare Test dennoch eingesetzt. Die Ergebnisse bestätigen, dass Hsp72 im Urin mit den verwendeten Kits qualitativ nachweisbar ist.³

Der Proteinnachweis im ELISA²⁰ arbeitet im kommerziell verfügbaren Kit mit in 96-

¹Das in der HSP-Studie untersuchte Hsp72 gehört zur Familie der Hsp70.

²EKS-700A wurde während der Laufzeit der Studie vom Hersteller nicht mehr angeboten und durch EKS-700B ersetzt.

³Der Hersteller weist mit folgendem Hinweis auf dennoch geltende mögliche Einschränkungen hin: »This assay has been validated for use with cell lysates and tissue extracts. Other sample types or matrices (e. g. urine, cerebrospinal fluid, cell culture supernatant, etc.) may contain interfering factors that can compromise the performance of the assay or produce inaccurate results.«⁴⁹ S. 20

Well-Platten vorgelegten monoklonalen Mausantikörpern, die hier spezifisch für Hsp70 sind. Der verwendete Kit ist laut Herstellerangaben spezifisch für native und rekombinante Hsp70 und detektiert zwar Hsp72, *nicht* aber andere Hsp70, wie zum Beispiel Hsc70, Grp78, DnaK (Hsp70-Äquivalent in *Escherichia coli*), rekombinantes *Mycobacterium tuberculosis*-Hsp71 oder menschliches Hsp60.⁴⁹

Das in der Probe enthaltene Hsp72 bindet an die im ELISA-Kit vorgelegten monoklonalen Mausantikörper und wird anschließend mit einem für Hsp70 spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörper detektiert. Dieser wird wiederum mit einem an Meerrettich-Peroxidase gebundenen sekundären Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gebunden. Anschließend werden alle 96 Wells einer Assayplatte mit Tetramethylbenzidin (TMB) entwickelt, proportional zur in den Proben enthaltenen Menge an Hsp72 färbt sich die Probe blau. Mit einer Säurelösung wird dieser Entwicklungsprozess definiert gestoppt, hierdurch findet ein Farbumschlag zu gelb statt. Anschließend kann der Assay in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450nm automatisiert ausgelesen werden. Zur Kalibrierung wird eine in der Assayplatte vorgelegte Standardreihe aus Hsp70-Standard des Kit-Herstellers verwendet.

Die Assays wurden entsprechend der Betriebsanleitung des Herstellers durchgeführt, mit Ausnahme des Schrittes der Probenextraktion, da der Kit vom Hersteller für die Analyse von Zelllysaten vorgesehen ist. Statt in einem Extraktionspuffer gelöst zu werden, wurden die Urinproben direkt mit dem ELISA-Puffer (*Sample Diluent*) gemischt. Eingesetzt wurden jeweils 5 μ l Urinprobe in 1:20-Verdünnung zu *Sample Diluent* (vorgegeben ist minimal eine 1:4-Verdünnung, um Matrixinterferenzen zu vermeiden). Da es beim ELISA im Rahmen der HSP-Studie nur um einen qualitativen, nicht einen quantitativen Nachweis von Hsp72 in den Urinproben ging, wurde auf eine Berechnung der Hsp72-Konzentrationen im Urin verzichtet.

3.2.3 Molekulargenetische Analyse

Die molekulargenetische Analyse der Blutproben der Probanden dient der Feststellung des Producer-Status für Hsp72 der Studienteilnehmer. Die Analyse gliedert sich in die drei Schritte DNA-Extraktion aus Vollblut, PCR und PCR-Analyse.

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den EDTA-Vollblutproben wurde mit dem Quiagen FlexiGene DNA-Kit (Quiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung für die Isolierung von DNA aus 100-500 μ l Vollblut durchgeführt.⁴⁴² Das Prinzip der DNA-Extraktion mit diesem Kit basiert auf der Lyse der in der Vollblutprobe enthaltenen Zellen. Anschließend werden durch

⁴Bei allen Proben, von denen mindestens 300 μ l Vollblut vorlagen, wurde das Protokoll für 300 μ l angewandt. Bei einigen Proben waren nur 100 μ l Vollblut vorhanden, bei diesen wurde das adaptierte Protokoll für 100 μ l Vollblut angewandt. Der Versuch, aus dieser geringen Menge Vollblut DNA zu extrahieren, war in keinem Fall erfolgreich.

Zentrifugation DNA-enhaltende Zellkerne und Mitochondrien gesammelt, in Puffer resuspendiert und anschließend mit Hilfe eines chaotropischen Salzes und einer unspezifischen Protease denaturiert. Die übrig bleibende DNA wird in Isopropanol ausgefällt, erneut durch Zentrifugation gewonnen, in 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in einem Hydrationspuffer gelöst.⁴²

Die Blutproben wurden entsprechend der Herstellerempfehlung möglichst rasch in einem 37°C warmen Wasserbad unter Bewegung aufgetaut. Die mit dem Kit erzielbare DNA-Ausbeute aus 300 µl Vollblut wird vom Hersteller mit 11-14 µg angegeben. Die erhaltene DNA soll maximal 150 Kilobasen (kB) groß sein und damit für alle weiteren Anwendungen, z. B. PCR geeignet sein. Das Protokoll für die Isolation⁴² wurde exakt eingehalten und die gewonnene DNA direkt in der PCR weiterverarbeitet.

PCR

Mit Hilfe der PCR⁴⁶ (Polymerasekettenreaktion, engl. *polymerase chain reaction*) kann ein kurzer Abschnitt der DNA schnell und automatisiert vervielfältigt werden und dadurch in der Folge detektiert werden. Die PCR erfolgte automatisiert in einem Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg).

Die extrahierte DNA wird bei hoher Temperatur denaturiert. Nach dem Abkühlen werden zwei Oligonukleotid-Primer (siehe Tabelle 9) verwendet, um das gewünschte DNA-Fragment aufzufinden. Eine in der Probenlösung enthaltene DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, New England BioLabs, Frankfurt am Main) synthetisiert aus zugegebenen Nucleosidtriphosphaten bei steigender Temperatur das gesuchte Fragment (Elongationszeit hier: 40 Sekunden), das sich zwischen den beiden Primern befindet. Dieser Vorgang wird 20-50 mal (hier: 30 mal) wiederholt. Die in der DNA-Extraktion gewonnene DNA wurde entsprechend Tabelle 7 automatisiert in die PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer (Metabion, Martinsried) sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Anschließend wurde das PCR-Ergebnis mit dem PCR-Reinigungskit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Betriebsanleitung des Herstellers³⁶ gereinigt, um DNA-Fragmente und Primer-Dimere zu entfernen.

Die Restriktion der in der PCR vervielfältigten DNA schließlich wurde mit dem Restriktionsenzym Pst I (New England BioLabs, Frankfurt am Main) bei 37°C für zwei Stunden im Wasserbad durchgeführt. Der Restriktionsansatz ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

PCR-Analyse

Zum Auftrennen und Sichtbarmachen des in der PCR vervielfältigten DNA-Abschnittes wurde eine Gelelektrophorese in einprozentigem Agarosegel in einer Agarosegelkammer (BioRad, München) durchgeführt. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte im Dunkeln mit einer Fluoreszenzkamera (Agfa-Gevaert, Düsseldorf), die Ergebnisse wurden ausgedruckt, ausgewertet, beschriftet und archiviert.

Tabelle 10 kann die Zusammensetzung des verwendeten Gels entnommen werden. Agarose und Wasser werden für ca. 90 Sekunden bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt, anschließend

Gel	Menge	Substanz
10%-iges Running-Gel	1,7ml	Polyacrylamid
	1,9ml	ddH ₂ O
	1,25ml	Puffer A
	50µl	SDS (20%)
	50µl	APS (10%)
	2µl	TEMED
Stacking-Gel	0,67ml	Polyacrylamid
	2,7ml	ddH ₂ O
	0,5ml	Puffer B
	40µl	SDS (20%)
	40µl	APS (10%)
	4µl	TEMED

Tabelle 4: Gele für Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

das Ethidiumbromid zugegeben. Nach zwanzigminütigem Härten ist das Gel verwendbar. Die Gelelektrophorese wurde mit jeweils 5 µl DNA + 1 µl Laemmli-Puffer für 30 Minuten bei konstant 100 V durchgeführt. In jedem Gel wurde eine 100 bp-DNA-Leiter mitpipetiert, um die DNA-Abschnitte zuordnen zu können.

3.2.4 Statistische Analyse

Für Unterstützung bei der statistischen Analyse der Daten dankt der Autor Dr. Philipp Pagel vom Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München.

Die Daten wurden tabellarisch in Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA). Als Signifikanztest auf Unabhängigkeit wurde der exakte Test nach Fisher (Fisher's Exact Test for Count Data) angewandt. Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Puffer	Konzentration	Substanz	pH
Puffer A	3 ^{mol} /L ca. 48ml bis 100ml mit	TRIS HCl 1 ^{mol} /L ddH ₂ O auffüllen	8,9
Puffer B	0,47 ^{mol} /L 25,6ml bis 100ml mit	TRIS H ₃ PO ₄ 1 ^{mol} /L ddH ₂ O auffüllen	6,7
Elektrophoresepuffer (10x)	250 ^{μmol} /L 1,92 ^{mol} /L 0,02	TRIS Glycin SDS	8,6
Running Buffer	70ml bis 700ml mit	Elektrophoresepuffer (10x) ddH ₂ O auffüllen	
Transferpuffer	100ml 200ml 700ml	Elektrophoresepuffer (10x) Methanol ddH ₂ O	
TBS-Tween (TBS-T)	20 ^{μmol} /L 150 ^{μmol} /L 0,05%	TRIS-HCl NaCl Tween 20	7,5
PBS-Tween (PBS-T)	1l 0,5ml	PBS Tween 20	
TBST + Milchpulver	5%	Trockenmilchpulver	in TBS-T
Probenpuffer	7,5ml 0,2g 600 ^{μl} 36mg 1,6mg bis 10ml mit	Puffer B für SDS-PAGE SDS (20%) β-Mercaptoethanol Bromophenol-Blau Glycerin ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle 5: Puffer für Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.

Antikörper	Art	Hersteller
Anti-Hsp70 (Hsp72) (Primärer Antikörper)	Rabbit-AntiHsp70 (Hsp72) Polyclonal Antibody Produktnr.: SPA-812	Stressgen Victoria Kanada
Goat-Anti-Rabbit IgG (Sekundärer Antikörper)	Goat-Anti-Rabbit IgG (H + L), peroxidasekonjugiert Produktnr.: 31460	Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford USA

Tabelle 6: Antikörper für den Western-Blot.

Substanz	Menge
DNA	6 μ l
Primer forward	1 μ l
Primer reward	1 μ l
Betain	5 μ l
dNTPs	1 μ l
Taq-Polymerase	1 μ l
Taq-Puffer (Peqlab, Erlangen)	5 μ l
H2O	30 μ l

Tabelle 7: Ansatz für die PCR.

Substanz	Menge
PCR-Produkt	10 μ l
Pst I	2 μ l
Restriktionspuffer	2 μ l
Bovines Serumalbumin (BSA)	0,2 μ l
H2O	5,8 μ l

Tabelle 8: Ansatz für die PCR-Restriktion.

Primer	Oligonukleotidsequenz	Oligo-ID
Hsp72-PstI-forward	5'-ACC CTG GAG CCC GTG GAG AA-3'	60721B3-0523B05
Hsp72-PstI-reward	5'-CAC CCG CCC GCC CCG TAG G-3'	60721B3-0523C05

Tabelle 9: Für die PCR verwendete Primer.

Substanz	Menge
Agarose	1g
H ₂ O	100ml
Ethidiumbromid	20 μ l

Tabelle 10: Ansatz für einprozentiges Agarosegel.

4 Ergebnisse

Bis zum Stichtag (30. September 2009) wurden 22 Probanden in die Studie eingeschlossen. Für alle 22 Probanden wurde entsprechend der Einschlusskriterien entschieden, ob sie ein akutes Nierenversagen erlitten hatten. In von allen Probanden vorliegenden Urinproben wurde mit Hilfe des Western Blots bestimmt, ob HSP im Urin nachweisbar ist. Von 15 der 22 Probanden konnte ferner mit Hilfe der PCR-Analyse festgestellt werden, ob es sich bei ihnen um Wildtyp-Träger oder Träger einer heterozygoten bzw. homozygoten Mutation bezüglich des Hsp72-Producer-Status' handelt. Die Ergebnisse für alle 22 eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

4.1 Akutes Nierenversagen

Anhand der Auswertung der über das klinische Informationssystem (KIS) des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München für die Probanden verfügbaren Daten wurde entsprechend der in Kapitel 2 wiedergegebenen Einschlusskriterien entschieden, ob die Patienten die Studienkriterien für das Vorliegen eines akuten Nierenversagens erfüllten oder nicht. Zehn der 22 in die Studie eingeschlossenen Probanden erfüllten die definierten Kriterien für das Vorliegen eines akuten Nierenversagens, zwölf Probanden erfüllten die Kriterien nicht.

4.2 Hsp72 im Urin

Der Urin der 22 bis zum September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Patienten wurde wie in Abschnitt 3.1.1 geschildert gewonnen. Die Urinproben wurden gesammelt im Western Blot und im ELISA untersucht, das qualitative Ergebnis »Hsp72 im Urin« bzw. »Kein Hsp72 im Urin« in eine Ergebnistabelle eingetragen. Bei elf von 22 Probanden konnte im Urin das Vorliegen von Hsp72 nachgewiesen werden. Die Hsp72-positiven Probanden waren nicht identisch mit den ANV-positiven Probanden (siehe Tabelle 12).

Von einigen Patienten lagen keine ausreichenden Urinmengen für sowohl Western Blot als auch ELISA vor. Bei diesen Patienten wurde der Western Blot als etabliertes Verfahren zum Nachweis von Hsp72 im Urin gegenüber dem ELISA bevorzugt. Wegen der nicht durchgängigen Verfügbarkeit der ELISA-Kits beim Hersteller konnte zudem nicht in allen Urinproben Hsp72 zuverlässig sowohl im Western Blot als auch durch ELISA nachgewiesen werden. Weil wegen erheblicher Wartezeit auf einen verfügbaren Hsp72-ELISA-Kit einige Proben erst mit deutlicher Zeitverzögerung nach langer Lagerung im gefrorenen Zustand im

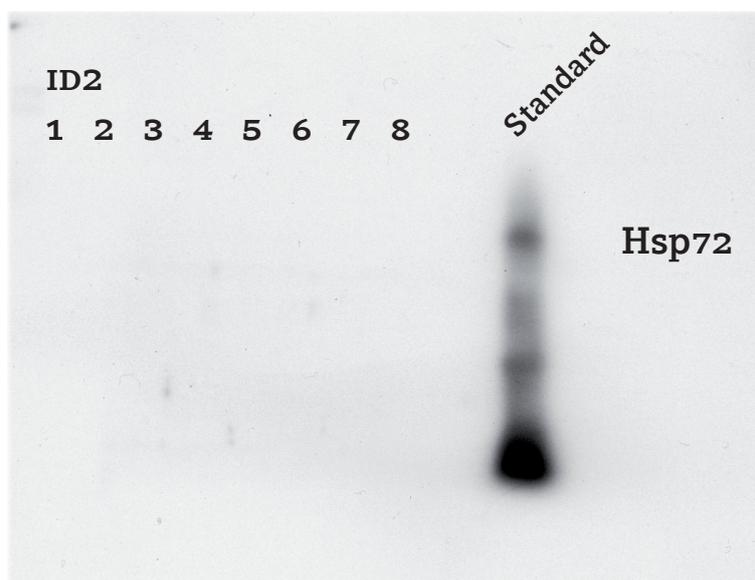


Abbildung 1: Western Blot gegen Hsp72 qualitativ im Urin für Patient ID2. Acht Proben, kein Hsp72 im Urin.

ELISA untersucht werden konnte, ließen sich positive Western-Blot-Ergebnisse hier nicht in allen Fällen im ELISA reproduzieren. In diesen Fällen wird von einem richtig-positiven Ergebnis des Western-Blots ausgegangen und angenommen, dass mittels Western Blot im Urin nachgewiesenes Hsp72 während der Lagerung im gefrorenen Zustand denaturiert ist und somit nicht mehr nachzuweisen war.

Beispielhafte Western Blots sind in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben. Eine beispielhafte ELISA-Auswertung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Ergebnisse der Western Blots und ELISA-Auswertungen sind in Tabelle 12 unter dem Punkt »Hsp72 im Urin« aufgeführt.

Auffällig ist, dass bei nahezu allen Patienten, bei denen Hsp72 im Urin nachweisbar war, im Western Blot ein Hsp72-Peak am ersten Tag nachweisbar war, der entweder bereits am zweiten Beobachtungstag vollkommen verschwunden war (negative Probe) bzw. deutlich abgefallen war.

4.3 Molekulargenetischer Producerstatus

Das Blut der 22 bis zum September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Patienten wurde wie in Abschnitt 3.1.2 geschildert gewonnen. Aus ethischen Gründen konnten nicht von allen Patienten ausreichende Blutmengen für eine molekulargenetische Untersuchung gewonnen werden. Laut Studiendesign und Ethikantrag ist es nicht gestattet, eine Blutentnahme alleine zu Studienzwecken durchzuführen. Somit musste auf bei regulären Blutentnahmen zu viel entnommenes Blut zurückgegriffen werden. Auf die im Studiendesign (siehe

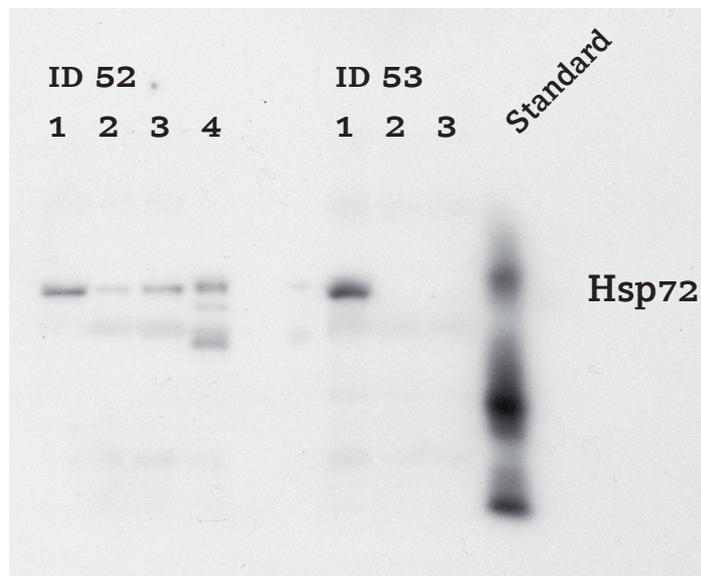


Abbildung 2: Western Blot gegen Hsp72 qualitativ im Urin für Patienten ID52 und ID53. ID52: Vier Proben, abnehmende Hsp72-Mengen im Urin. ID53: Drei Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag.

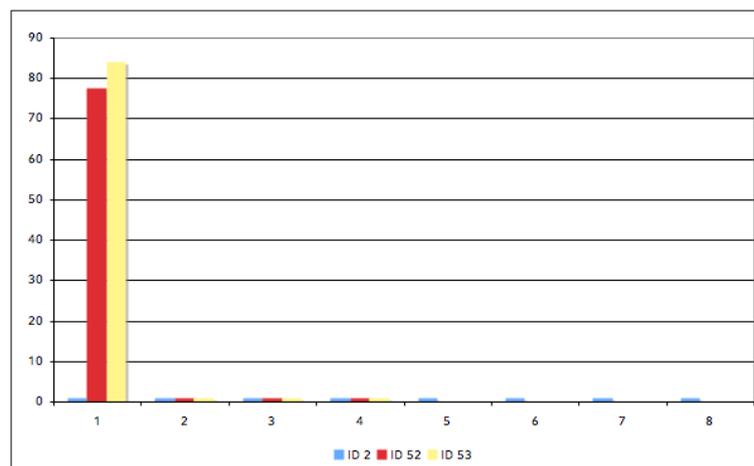


Abbildung 3: ELISA auf Hsp72 qualitativ im Urin. X: Tag. Y: Konzentration von Hsp72 im Urin. ID2: Acht Proben, kein Hsp72 im Urin. ID52: Vier Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag. ID53: Vier Proben, Hsp72-Peak am ersten Tag.

Bande bei	Hsp72-Producerstatus	Genetik
189bp	Wildtyp	(1267)AA
116bp & 189bp	Heterozygotie	(1267)AG
116bp	Homozygotie	(1267)GG

Tabelle 11: Zuordnung des molekulargenetischen Ergebnisses zum Producerstatus.

Abschnitt 6.1 im Anhang) ursprünglich vorgesehene Untersuchung von Blut auf Hsp72 im Serum und die Untersuchung auf andere Routineparameter wurde deshalb zugunsten der molekulargenetischen Untersuchung auf den Hsp72-Producer-Status verzichtet.

Die Patienten, von denen kein oder nicht in ausreichender Menge Blut zur molekulargenetischen Analyse vorlag, sind in Tabelle 12 unter »Genetik« anhand des Eintrags »N/A« zu identifizieren (sieben von 22 eingeschlossenen Probanden).

Entsprechend der in Abschnitt 1.1.5 geschilderten Zuordnung der molekulargenetischen Ergebnisse zum Producer-Status für Hsp72 der Patienten in Übereinstimmung mit Fekete et al.²³ erfolgte die Zuordnung wie in Tabelle 11 angegeben. Das Ergebnis ist in Tabelle 12 unter »Genetik« wiedergegeben.

Sechs der Probanden weisen den genetischen Wildtyp auf, sieben Probanden sind für den Low-Producer-Status für Hsp72 heterozygot, zwei Probanden sind für den Low-Producer-Status für Hsp72 homozygot. Bei sieben Probanden konnte keine genetische Analyse vorgenommen werden bzw. war der Versuch der genetischen Analyse wegen unzureichenden Materials erfolglos.

4.4 Daten

In Tabelle 12 sind die erhobenen Daten der 22 bis September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Probanden dargestellt.

ID	Alter	ANV	Hsp72 im Urin	Genetik	Outcome	Einschlusskriterium
1	5 0/12	Ja	Ja	Wildtyp	überlebt	Sepsis
4	3 10/12	Ja	Ja	Heterozygotie	überlebt	Schock
5	6 10/12	Ja	Ja	N/A	überlebt	Schock
11	2 0/12	Ja	Ja	N/A	überlebt	Schock
8	17 6/12	Ja	Nein	Wildtyp	überlebt	Schock
2	1 10/12	Ja	Nein	Heterozygotie	überlebt	Schock
12	10/12	Ja	Nein	Heterozygotie	überlebt	Schock
3	1 3/12	Ja	Nein	Homozygotie	überlebt	Sepsis
56	6/12	Ja	Nein	N/A	verstorben	Schock
51	0/12	Ja	Nein	N/A	überlebt	Schock
7	3/12	Nein	Ja	Wildtyp	überlebt	Schock
21	7 1/12	Nein	Ja	Wildtyp	überlebt	Schock
52	0/12	Nein	Ja	Wildtyp	überlebt	Schock
53	0/12	Nein	Ja	Heterozygotie	verstorben	Schock
54	0/12	Nein	Ja	Heterozygotie	überlebt	Schock
24	0/12	Nein	Ja	Homozygotie	überlebt	Schock
22	0/12	Nein	Ja	N/A	überlebt	Asphyxie
58	0/12	Nein	Nein	Wildtyp	überlebt	Schock
6	0/12	Nein	Nein	Heterozygotie	überlebt	Schock
55	0/12	Nein	Nein	Heterozygotie	überlebt	Asphyxie
23	3 7/12	Nein	Nein	N/A	überlebt	Sepsis
57	0/12	Nein	Nein	N/A	überlebt	Schock

Tabelle 12: Daten der 22 bis September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Probanden.
N/A: Zu wenig oder kein Blut für die molekulargenetische Analyse vorhanden.

Genetik	ANV	Hsp72 im Urin	
		Ja	Nein
Heterozygotie	Ja	1	2
	Nein	2	2
Homozygotie	Ja	0	1
	Nein	1	0
Wildtyp	Ja	1	1
	Nein	3	1

Tabelle 13: Kreuztabellierung der drei Faktoren (15 vollständige Fälle eingeschlossen).

Genetik	Hsp72 im Urin		Summe
	Ja	Nein	
Wildtyp	4	2	6
Heterozygotie	3	4	7
Homozygotie	1	1	2
Summe	8	7	15

Tabelle 14: Aufstellung des Zusammenhangs zwischen Hsp72 im Urin und genetischem Status (15 vollständige Fälle eingeschlossen).

4.5 Statistik¹

Für die statistische Auswertung der 22 in die HSP-Studie eingeschlossenen Probanden liefert Tabelle 13 für die drei untersuchten Faktoren aus Ergebnistabelle 12 die Ergebnisse. Enthalten sind nur die vollständigen Fälle, bei denen auch eine genetische Typisierung möglich war (15 von 22 Datensätzen).

4.5.1 Genetik vs. Hsp72 im Urin

Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen dem genetischen Producer-Status für Hsp72 der Probanden und dem Vorkommen von Hsp72 im Urin? Tabelle 14 listet den Zusammenhang zwischen genetischem Status und Hsp72 im Urin auf, Abbildung 4 macht die Daten anschaulich.

Aus Tabelle 14 und Abbildung 4 wird deutlich, dass sich bei genetischen Wildtypträgern

¹Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung dankt der Autor Dr. Philipp Pagel vom Institut für Genomorientierte Bioinformatik der Technischen Universität München.

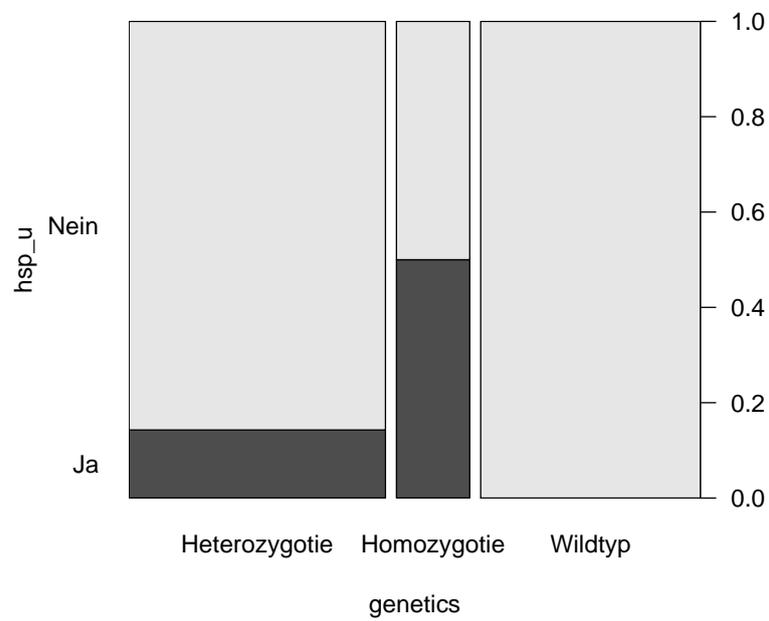


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen Hsp72 im Urin und genetischem Status (15 vollständige Fälle eingeschlossen).

Hsp72 im Urin	ANV		Summe
	Ja	Nein	
Ja	4	7	11
Nein	6	5	11
Summe	10	12	22

Tabelle 15: Aufstellung des Zusammenhangs zwischen Hsp72 im Urin und ANV (22 Fälle eingeschlossen).

häufiger Hsp72 im Urin nachweisen ließ als bei genetisch heterozygoten oder homozygoten Probanden bezüglich des Hsp72-Low-Producer-Status'. Mit einem Fisher-Test kann die Frage beantwortet werden, ob dieser Unterschied signifikant ist:

```
> fisher.test(table(foo[,c('genetics', 'hsp_u')])) )
```

Fisher's Exact Test for Count Data

```
data: table(foo[, c("genetics", "hsp_u")])
p-value = 0.7824
alternative hypothesis: two.sided
```

Mit einem p-Wert von $\approx 0,78$ ist der Unterschied nicht statistisch signifikant (Grenzwert $p < 0,05$).

4.5.2 ANV vs. Hsp72 im Urin

Korreliert der Nachweis von Hsp72 im Urin mit dem Nichtauftreten eines akuten Nierenversagens? Um die Datengrundlage anschaulich zu machen, wird in Tabelle 15 und Abbildung 5 die Beziehung zwischen im Urin nachweisbaren Hsp72 und Auftreten eines nach den Studienkriterien definierten ANV dargestellt.

Mit Hilfe eines Fisher-Tests kann wiederum die Frage beantwortet werden, ob der Unterschied zwischen Vorliegen von Hsp72 im Urin bzw. fehlendem Vorliegen von Hsp72 im Urin und dem Eintreten eines ANV signifikant ist oder nicht:

```
> fisher.test(table(foo[,c('hsp_u', 'anv')])) )
```

Fisher's Exact Test for Count Data

```
data: table(foo[, c("hsp_u", "anv")])
p-value = 0.3350
alternative hypothesis: true odds ratio is less than 1
```

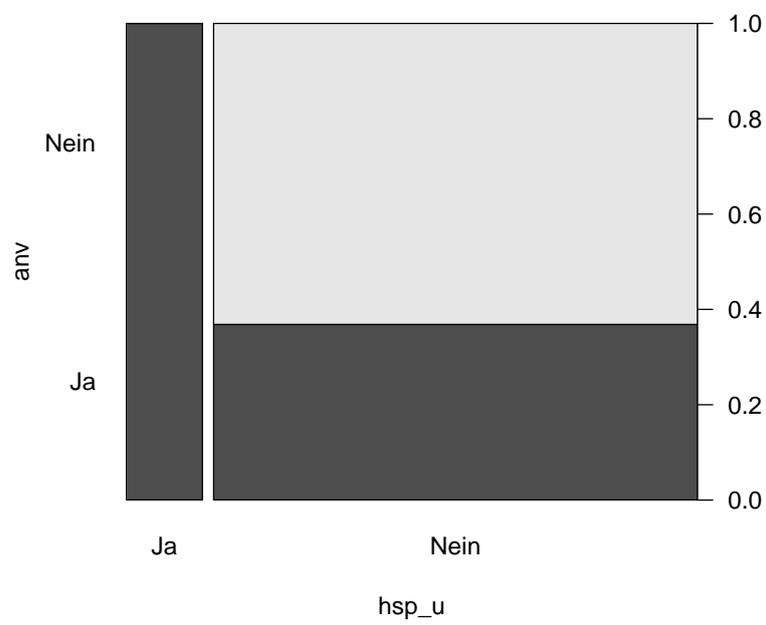


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen Hsp72 im Urin und ANV (22 Fälle eingeschlossen).

95 percent confidence interval:

0.000000 2.691223

sample estimates:

odds ratio

0.4928948

Mit einem p-Wert von ≈ 0.34 ist der Unterschied nicht signifikant (Grenzwert $p < 0,05$).

4.6 Fallzahlberechnung

Die in der HSP-Studie bislang gesammelten Daten der 22 eingeschlossenen Probanden liefern keine signifikanten Ergebnisse. Allerdings ist mit den vorläufigen Ergebnissen der Zwischenauswertung erstmals die Berechnung der erforderlichen Stichprobengröße möglich, die erreicht werden muss, um mit ausreichender Power ein signifikant unterschiedliches Ergebnis erkennen zu können.

Nach Kirkwood und Sterne³², S. 420, Gleichung 6, berechnet man die benötigte Fallzahl pro Gruppe wie folgt:

$$n = \frac{\left(u\sqrt{p_1(1-p_1)} + p_0(1-p_0) + v\sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})}\right)^2}{(p_0 - p_1)^2}$$

$$u = z_{1-\beta}$$

$$v = z_{1-\alpha} \quad (\text{einseitig})$$

$$v = z_{1-\frac{\alpha}{2}} \quad (\text{zweiseitig})$$

Im Falle eines einseitigen Tests, eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0.05$ und einer Power von $1 - \beta = 0.8$ ergibt sich demnach eine minimale Stichprobengröße von 92 Patienten pro Gruppe – also insgesamt 184 Patienten:

```
> fz.prop(6/11, 4/11, alpha=0.05, power=0.8, twosided=F)
u= 0.8416212
v= 1.644854
[1] 91.68616
```

5 Diskussion

Von 22 bis September 2009 in die HSP-Studie eingeschlossenen Probanden haben zehn ein akutes Nierenversagen erlitten, zwölf haben kein akutes Nierenversagen erlitten.

5.1 Akutes Nierenversagen und Hsp72 im Urin

Von den zehn Patienten mit akutem Nierenversagen konnte bei vier Hsp72 im Urin nachgewiesen werden, bei sechs nicht. Bei den zwölf Probanden ohne akutes Nierenversagen lag bei sieben Hsp72 im Urin vor, bei fünf nicht. Die Auswertung ergibt, dass der Nachweis von Hsp72 im Urin statistisch nicht mit dem Ausbleiben eines akuten Nierenversagens korreliert, ebensowenig korreliert das Auftreten eines akuten Nierenversagens mit dem Nachweis von Hsp72 im Urin.

Nach den vorläufigen Ergebnissen der Zwischenauswertung würde die Nullhypothese bestätigt, nach der es keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Hsp72 im Urin und dem Auftreten oder Ausbleiben eines akuten Nierenversagens gibt. Die Hypothese würde zurückgewiesen.

Allerdings ist die bislang erreichte Patientenzahl in der HSP-Studie zu niedrig, als dass mit Hilfe der Zwischenauswertung ein Urteil über die Nullhypothese bzw. die Hypothese gefällt werden könnte.

5.2 Hsp72 im Urin und molekulargenetischer Producerstatus für Hsp72

Unter den Probanden mit akutem Nierenversagen waren zwei Probanden mit dem genetischen Wildtyp-Producerstatus für Hsp72, drei heterozygote und ein homozygoter Proband. Bei den Probanden ohne akutes Nierenversagen handelt es sich um vier Wildtyp-Träger, vier heterozygote und einen homozygoten Probanden. Die Ergebnisse sind nur eingeschränkt zu beurteilen, da von insgesamt sieben Probanden der molekulargenetische Producer-Status für Hsp72 nicht vorliegt. Die Auswertung erbringt auch hier keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem molekulargenetischen Producerstatus für Hsp72 und dem Vorliegen von Hsp72 im Urin.

Die Ergebnisse der Untersuchung auf den molekulargenetischen Producerstatus der Probanden sind trotz der kleinen Fallzahl von nur 22 Probanden im Einklang mit bisher publizierten Werten für den Producerstatus für Hsp72. In der HSP-Studie ist die Verteilung der Allele und der Allelkombination: 40%(1267)AA, 46,7%(1267)AG und 13,3%(1267)GG. Das

Autor	A	G
Goate et al. ²⁵	0,38	0,62
Caplen et al. ¹⁹	0,35	0,65
Ratanachaiyavong et al. ⁴³	0,36	0,54
HSP-Studie	0,37	0,63

Tabelle 16: Allelhäufigkeit

entspricht einem Allelverhältnis von 63 %G zu 37 %A. Der Vergleich mit bisher publizierten Daten ist in Tabelle 16 wiedergegeben.

5.3 Fallzahlberechnung

Mit dem Ergebnis der Fallzahlberechnung konnten wir dank der HSP-Studie erstmals ermitteln, dass insgesamt 184 Patienten für die statistisch ausreichend gesicherte Beantwortung der Fragestellung benötigt werden: 92 in der Gruppe der Patienten mit akutem Nierenversagen, 92 in der Gruppe der Patienten ohne akutes Nierenversagen.

5.4 Analyse

Die HSP-Studie ist als »*Proof-of-Principle*«- und reine Beobachtungs-Studie konzipiert. Vor Beginn der HSP-Studie war nicht klar, ob bei allgemein schwerkranken pädiatrischen Patienten zwischen Geburt und 18. Lebensjahr Hsp72 im Urin nachzuweisen ist oder nicht. Diese Frage wurde vor der HSP-Studie nur bei Tieren (bevorzugt bei Ratten) und bei Spezialpopulationen wie z. B. nierentransplantierten Patienten beantwortet.

Bis heute (Frühjahr 2011) sind bei einer entsprechenden Abfrage mit den Suchwörtern »HSP« bzw. »Hsp72« und »acute renal failure« bzw. »acute kidney failure« in der bio-medizinischen Datenbank *Pubmed* (<http://www.pubmed.gov>) und im Register der US-Regierung für klinische Studien *ClinicalTrials* (<http://www.clinicaltrials.gov>) keine Ergebnisse zu finden, die an allgemein schwerkranken pädiatrischen Patienten erhoben wurden. Demgegenüber gibt es eine Vielzahl auch neuester Studien, die Hsp72 als prognostischen Faktor des akuten Nierenversagens z. B. an Ratten untersuchen.^{11;54}

Die vorläufigen Ergebnisse der HSP-Studie zeigen, dass es sowohl im Western Blot als auch im ELISA möglich ist, Hsp72 im Urin pädiatrischer Patienten mit Schock, Sepsis oder Asphyxie, aber ohne renale Vorerkrankung nachzuweisen. Damit ist erstmals die grundsätzliche Voraussetzung gegeben, die Studienhypothese zu überprüfen.

Beim Nachweis von Hsp72 im Urin der Probanden fällt auf, dass Hsp72 offenbar im Sinne eines An-Aus-Mechanismus aus der geschädigten Niere in den Urin ausgeschwemmt wird. Das wird deutlich durch den Hsp72-Peak im Western Blot am ersten Tag der Beobachtung im Rahmen der HSP-Studie – also sofort, nachdem eines der Einschlusskriterien Schock,

Sepsis oder Asphyxie erfüllt ist und damit ein ischämischer Insult stattgefunden hat. Ob dieser An-Aus-Mechanismus die Folge der nach dem ischämischen Insult wieder beginnenden Harnproduktion ist oder Folge einer eventuellen aktiven Sekretion von Hsp72 aus den geschädigten Tubuluszellen in den Urin, ist im Rahmen der HSP-Studie nicht untersucht worden. Die Untersuchung dieser Frage sollte mit Hilfe zellbiologischer Versuche untersucht werden, die in Abschnitt 5.5.3 näher erläutert werden.

Die bislang vorliegenden Ergebnisse der ersten 22 in die HSP-Studie eingeschlossenen Patienten lassen keine endgültige Interpretation zu. Die erreichte Fallzahl ist zu gering, um die Studienhypothese bestätigen oder falsifizieren zu können.

Die Ursache für die auch nach einem Einschlusszeitraum von vier Jahren unbefriedigende Zahl an Probanden ist vermutlich im Studiendesign angelegt. Zwar wurde die Studie als quasi multizentrische Studie an mehreren Standorten in München, Augsburg, Memmingen, Regensburg und Rosenheim geplant und formell auch durchgeführt. Allerdings wurden sämtliche in die Studie aufgenommenen Patienten ausschließlich aus einer Klinik rekrutiert, dem Dr. von Haunerschen Kinderspital des Klinikums der Universität München. Alle anderen an der Studie beteiligten Kliniken sind keine Universitätskliniken. Das Dr. von Haunersche Kinderspital verfügt am Campus Innenstadt über eine pädiatrische Intensivpflegestation (PIPS) und zwei neonatologische Intensivpflegestationen (NIPS), am Campus Großhadern über eine weitere neonatologische Intensivpflegestation (NIPS). Alle 22 in die HSP-Studie aufgenommenen Probanden waren Patienten zweier Intensivpflegestationen am Campus Innenstadt, wo auch die Studiengruppe ihren Sitz hat. Für eine erfolgreiche Probandengewinnung erscheint es daher unzureichend, eine Studie mit der aktuell berechneten Zahl an benötigten Probanden in nur einer Universitätsklinik durchzuführen. Ein echtes multizentrisches Vorgehen, das mehrere universitäre Standorte einbezieht, die jeweils eine ausreichend große Zahl akut schwer erkrankter Kinder behandeln, ist unabdingbare Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss einer Studie wie der HSP-Studie.

In dieser Situation erscheint es sinnvoll, die HSP-Studie als eine Pilotstudie zu verwenden, deren bisherige Ergebnisse zur Berechnung der erforderlichen Stichprobengröße einer weiteren Hsp72-Studie verwendet werden können. Mit Hilfe dieser neu zu planenden und durchzuführenden zweiten Studie kann so auf Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten Grundlagenerkenntnisse die Fragestellung der vorliegenden HSP-Studie beantwortet werden, nachdem die erforderliche Stichprobengröße erreicht wurde. Zudem kann die neue Hsp72-Studie von den im Rahmen der HSP-Studie gemachten Erfahrungen profitieren.

5.5 Ausblick

5.5.1 Prognostischer Faktor für das akute Nierenversagen

Bis heute gibt es keinen verlässlichen prognostischen Faktor für das Auftreten oder den Verlauf eines akuten Nierenversagens, weder bei pädiatrischen noch bei erwachsenen Patienten. Ein solcher Faktor wäre vor allem dann wertvoll für die klinische Behandlung betroffener Patienten, wenn er eine klare Unterscheidung erlaubte zwischen ANV-Risikopatienten und

Patienten, deren Risiko gering ist, ein akutes Nierenversagen zu entwickeln. Zudem sollte der Faktor im Alltag routinemäßig einfach und zu vertretbaren Kosten bestimmt werden können. Idealerweise würde ein solcher Faktor sich auch als Verlaufsparemeter während der Therapie eines eingetretenen akuten Nierenversagens eignen.

Ein prognostischer Faktor würde vor oder in der frühen Phase des akuten Nierenversagens eine der wahrscheinlichen Schwere des Verlaufs angepasste Therapie des Patienten ermöglichen. Zwar ist eine ursächliche Therapie des akuten Nierenversagens nicht möglich, doch könnte die Nierenersatztherapie durch Hämofiltration oder Dialyse rechtzeitig geplant und begonnen werden, wenn ein prognostischer Faktor das Risiko messbar machte, mit dem es zum akuten Nierenversagen kommt.

5.5.2 Hsp72 als prognostischer Faktor für das akute Nierenversagen

Hsp72 ist wie in der Einleitung dargestellt aus mehreren Gründen ein vielversprechender Kandidat für einen klinisch dringend benötigten prognostischen Faktor für das Auftreten bzw. den Verlauf eines akuten Nierenversagens. Die entscheidende Voraussetzung als Parameter zur Einschätzung des Risikos für ein ANV ist, ob in einer Weiterführung oder Neuaufgabe der HSP-Studie tatsächlich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten oder Ausbleiben von Hsp72 im Urin oder Blutserum und dem Auftreten oder Ausbleiben des akuten Nierenversagens besteht. Die Ergebnisse der noch durchzuführenden Untersuchungen werden auch Aufschluss darüber geben, ob Hsp72 als Verlaufsparemeter geeignet wäre, oder ob es wegen des vermuteten An-Aus-Mechanismus der Freisetzung in Blutserum und Urin dafür nicht in Frage kommt.

Wie die vorläufigen Ergebnisse der HSP-Studie zeigen, ist Hsp72 problemlos und mit technisch vertretbarem Aufwand in einfach zu gewinnenden Proben nachweisbar. Intensivmedizinisch betreuten Patienten wird aufgrund anderer routinemäßig erhobener Parameter wie z. B. dem C-reaktiven Protein (CRP) (nahezu) täglich Blut entnommen. Um eine Flüssigkeitsbilanz führen zu können, wird der Urin der Patienten üblicherweise über 24 Stunden gesammelt. Das gilt insbesondere für pädiatrische Patienten, bei denen die Flüssigkeitsbilanz eine größere Rolle spielt als bei erwachsenen Patienten²².

Beide Proben – Blut und Urin – könnten auch im klinischen Routinelabor durch Western Blot²⁷ bzw. ELISA⁵⁰ auf das Vorkommen von Hsp72 untersucht werden. Während das Western Blotting bei ausreichend hohem Durchsatz eine Methode mit niedrigen Kosten ist, sind die aktuell verfügbaren kommerziellen ELISA-Kits noch teuer.

Entscheidend für einen eventuellen Einsatz von Hsp72 im klinischen Alltag ist auch die Klärung des Pathomechanismus hinter der Freisetzung von Hsp72 in Blut und Urin, auf die in Abschnitt 5.5.3 eingegangen wird.

5.5.3 Aktive Sekretion vs. passive Freisetzung

Der Mechanismus, wie Hsp72 bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden in das Blutserum bzw. den Urin abgegeben wird, ist noch unklar. Um den Mechanismus zu klären, sind

Versuche an kultivierten Nierenepithelzellen notwendig.

Diese sollen durch Stimulation mit Lipopolysacchariden^{35;41;57} oder Erhitzen auf 60°C einem simulierten Ischämieschaden ausgesetzt werden. Vor und nach diesem Stressereignis wird intrazellulär und extrazellulär das Vorkommen von Hsp72 bestimmt. Zusätzlich werden Marker für Nekrose (Interleukin-18⁴⁰) bzw. Apoptose (Annexin V-Assay²⁴) bestimmt, um unterscheiden zu können, ob Hsp72 aktiv sezerniert oder aber nach dem nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang passiv freigesetzt wird. Darüber hinaus könnte eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen vor und nach dem Stress Aufschluss über die intrazellulären Abläufe geben.

Die Aufklärung des Pathomechanismus erlaubt die Einschätzung, ob Hsp72 neben einer Markereigenschaft sogar eine therapeutische Potenz besitzen könnte. Wäre die Apoptose der Nierenepithelzellen die Ursache für das Freisetzen des Hsp72 in Blutserum und Urin, könnte in einer weiteren Untersuchung festgestellt werden, ob rekombinantes Hsp72 in seiner Eigenschaft als Chaperon die Apoptose verhindern könnte und so einen Beitrag zur schnelleren und vollständigeren Rekonstitution der Nierenepithelzellen leisten könnte.

5.5.4 Hsp72 und TLR4

Plasmamembranproteine der Klasse der Toll-Like-Rezeptoren binden unterschiedliche Pathogene. Der *Toll Like Receptor-4* (TLR-4) bindet Endotoxine.⁵⁸ Der Grad der Aktivierung des TLR-4 bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden kann Einfluss nehmen auf den Zellschaden, der durch das ischämische Ereignis entsteht. TLR4-Knockout-Mäuse sind vor der vollen Ausprägung eines Ischämie-Reperfusionsschadens geschützt.⁵⁶ Nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden steigt die Freisetzung von TLR-4 aus Tubuluszellen in den Urin im Tiermodell stark an. TLR-4 wird deshalb als Biomarker eines akuten Nierenversagens nach Ischämie-Reperfusionsschaden bzw. toxischen Nierenschäden diskutiert.⁵⁸

Neben der Untersuchung des Freisetzungsmechanismus von Hsp72 soll intrazellulär sowie extrazellulär vor und nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden bei kultivierten Nierenepithelzellen der Expressionsgrad von TLR-4 parallel zum Nachweis von Hsp72 bestimmt werden. Zusätzlich wird das Auftreten von Hsp72 intra- und extrazellulär vor und nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden in Nierenepithelzellen untersucht, die nach Transfektion von siRNA kein TLR-4 mehr exprimieren (Knockdown-Zellen).⁹

5.5.5 Hsp72 und Geranyl-Geranyl-Aceton

Geranyl-Geranyl-Aceton (GGA) induziert unspezifisch Hsp72. Es erhöht die Hsp72-Expression und reduziert im Tierversuch tubuläre Schäden und Organfunktionsschäden. Nach einer Ischämie kann es bei Wildtyp-Mäusen ebenfalls tubuläre und Organfunktionsschäden minimieren, nicht aber bei Hsp72-Knockout-Mäusen.⁵⁴

Unserer Arbeitsgruppe gelang es 2008 nicht, das nur in Japan produzierte GGA für Versuche an kultivierten Nierenepithelzellen zu erhalten. Nachdem es mittlerweile offenbar bei Wako Industries, Osaka, Japan, kommerziell verfügbar ist⁵⁴, sollte eine weitere

Reihe der oben geschilderten Versuche die Wirkung von GGA auf den Verlauf eines simulierten Ischämie-Reperfusionsschadens an kultivierten Nierenepithelzellen und die Hsp72-Freisetzung untersuchen.

5.5.6 Hsp72-Studie

Um die Fragestellung der HSP-Studie beantworten zu können, wird eine neu zu planende Hsp72-Studie empfohlen. Die HSP-Studie ist als quasi-multizentrische Studie am Standort München mit fünf weiteren Kliniken, in denen Probanden rekrutiert werden können, geplant worden. Nach vierjähriger Studiendauer sind alle eingeschlossenen Probanden in nur einer Klinik, dem Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München, rekrutiert worden. Die beiden beteiligten Intensivstationen (Neugeborenen-Intensivstation im Dr. von Haunerschen Kinderspital und Pädiatrische Intensivstation im Dr. von Haunerschen Kinderspital) behandeln unter anderem wegen des Fehlens einer routinemäßig im Haus durchgeführten Dialyse nur wenige Patienten, bei denen im Vorhinein ein potentiell erhöhtes Risiko für ein akutes Nierenversagen vermutet wird.

Um in realistischer Zeit die kritische Menge an benötigten Probanden erreichen zu können, ist eine tatsächliche multizentrische Durchführung unter Einbeziehung mehrere universitärer Standorte unerlässlich. Zudem drängt sich die Übertragung des Studiendesigns auf erwachsene Patienten unter Beibehaltung von Hypothese, sonstiger Einschluss- und Analysekr Kriterien auf. Alleine durch die in deutlich größeren Mengen verfügbaren zu analysierenden Materialien Urin und Blut könnten die Untersuchungen umfassender durchgeführt und die Ergebnisse detaillierter analysiert werden. Hinzu kommt eine deutlich höhere Zahl auf Erwachsenen-Intensivstationen behandelter Patienten, was das Erreichen der benötigten Probandenzahl in kürzerer Zeit realistisch erscheinen lässt. Es erscheint wichtig, eine solche Hsp72-Studie an erwachsenen Patienten in universitären Zentren durchzuführen, die routinemäßig auf dialysepflichtige Patienten eingerichtet sind. Diese Voraussetzung dürfte in der Erwachsenen-Intensivmedizin an Universitätskliniken nahezu flächendeckend gegeben sein.

Neben den organisatorischen Vorzügen ist die Notwendigkeit einer Hsp72-Studie an erwachsenen Probanden medizinisch gegeben: Auch bei erwachsenen Patienten fehlt ein prognostischer Faktor für das Auftreten und den Verlauf eines akuten Nierenversagens. Angesichts der drohenden Folgen für die Patienten wird ein prognostischer Faktor für das akute Nierenversagen dringend benötigt.

6 Anhang

6.1 Studiendesign

Im Folgenden wird der Wortlaut des Studiendesigns in der revidierten Fassung vom 28.9.2005 wiedergegeben, der von der Ethikkommission entsprechend dem in 6.2 aufgeführten Ethikantrag mit dem Ethikvotum vom 19.9.2005 unter Vorbehalt der Änderung der Patienteninformation genehmigt wurde. Der Autor dieser Dissertation war an der Erstellung des Studiendesigns inhaltlich maßgeblich beteiligt.

6.1.1 Generelle Information

Studienname

Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie).

Identifizierungsnummer (ClinicalTrials.gov)

Die Studie ist im Internetportal <http://www.clinicaltrials.gov> registriert. Sie trägt dort die Registrierungsnummer HSP-233-05 (Unique Protocol ID) und den Titel *Study of Heat Shock Proteins as Prognostic Factor of Acute Renal Failure in Children (HSP-Study)* (Brief Title). Die Registrierungsdaten werden mindestens halbjährlich aktualisiert und sind für jedermann einsehbar.

Institution

Die Studie wird im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München von der Arbeitsgruppe Glöckner im Forschungskubus geleitet.

Studienleitung und Prüfer

Studienleiter und Prüfer sind Frau Dr. med. Judith Glöckner-Pagel und Herr Dr. med. Karl Reiter (Dr. von Haunersches Kinderspital).

Studienpersonal

An der Studie beteiligt sind der medizinische Doktorand Dennis Ballwieser sowie das technische Assistenzpersonal der Arbeitsgruppe Glöckner im Forschungskubus des Dr. von Hau-

nerschen Kinderspitals. An der Auswertung der Studie ist Personal des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann beteiligt.

6.1.2 Hintergrundinformation

Hitzeschockproteine

Ein prognostischer Faktor für die Entwicklung des akuten Nierenversagens (ANV) bei Kindern wäre von großem Wert als Steuerungsinstrument in der Therapie. Chaperone aus der Familie der Hitzeschockproteine sind aussichtsreiche Kandidaten, die zugleich eine bedeutsame pathophysiologische Rolle in der Entstehung des ANV spielen und damit einen Ansatz für die Entwicklung neuer Therapieansätze bieten können.

Ein akutes Nierenversagen tritt bei bis zu 50 Prozent aller kritisch kranken Patienten auf und zeigt trotz Fortschritten in der symptomatischen Behandlung nach wie vor eine hohe Morbidität und Mortalität. Kommt es im Gefolge einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks wie auch bei Schockformen anderer Ursache zu einem Multiorganversagen, so stellt das Auftreten eines akuten Nierenversagens einen unabhängigen prognoseverschlechternden Faktor dar.

Stand der Forschung

In der Mehrzahl der Fälle liegt dem akuten Nierenversagen ein renaler Ischämie-/ Reperfusionsschaden zugrunde. Die Reaktion der Niere auf Ischämie/Reperfusion ist vielfältig. Persistierende Vasokonstriktion, tubuläre Obstruktion, zelluläre strukturelle und metabolische Veränderungen sowie inflammatorische Reaktionen sind pathogenetische Komponenten. Protektive Faktoren, die ein ANV verhindern oder beeinflussen können, sind wenig untersucht. Hitzeschockproteine spielen unter anderem eine gut untersuchte Rolle in der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts, so dass sie als protektive Faktoren bei ANV in Frage kommen.

Hitzeschockproteine sind eine Gruppe ubiquitär vorkommender zytoplasmatischer Zellproteine. Ihre Isoformen stellen bis zu fünf Prozent aller zellulären Proteine im Normalzustand und können bei Stress um bis zu 20 Prozent ansteigen. Die HSP-Produktion wird durch verschiedene zelluläre Stressoren wie Hitze, UV-Licht oder zytotoxische Agenzien angeregt. Alle Stoffe, die HSP induzieren, haben proteinschädigende Eigenschaften, die zu erhöhten zellulären Konzentrationen denaturierter Proteine führen.

Der durch HSP vermittelte Zellschutz wird durch die Stabilisierung des Zytoskeletts und die Chaperon-Funktion der HSP erreicht. Bei der renalen Ischämie wird das Aktinzytoskelett der tubulären Zellen zerrissen. HSP kommen in verschiedenen Nierenkompartimenten vor und werden bei renaler Ischämie angehäuft. Eine Rolle der HSP bei der Erholung von ischämieinduzierten Aktinfilamentrissen wird angenommen. Die Rolle der HSP bei zellulären Reparaturprozessen ist noch nicht vollständig verstanden. HSP wirkt unterdrückend

auf Signalproteine, die an der Apoptose beteiligt sind. Werden Medullazellen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, steigt die HSP-Expression, verbunden mit verbesserten Überlebensraten der Zellen, wenn sie erneut Stress ausgesetzt wurden. Eine erste Untersuchung zeigt signifikant erhöhte Plasmaspiegel von HSP 70 bei Kindern mit septischem Schock. Untersuchungen zur Funktion und klinischen Relevanz von extrazellulärem HSP 70 bei Sepsis stehen aus.

In Tierversuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass nur bei renaler Ischämie HSP 72 im Urin ausgeschieden wird, nicht aber bei Hyperthermie. Bei nierentransplantierten Kindern konnte HSP 72 innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Transplantation im Urin nachgewiesen werden. Im Urin pädiatrischer Patienten mit stabilem oder chronischem Nierenversagen war dagegen kein HSP 72 nachweisbar. Im Urin nachweisbares HSP 72 könnte ein Hinweis auf eine Stressreaktion und Verlust der Tubuluszellintegrität sein. Andere Studienergebnisse legen nahe, dass ein erhöhter Grundspiegel an HSP 72 bei Ratten ein Resistenzfaktor gegen renale Ischämie darstellen könnte.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass genetisch bedingte HSP 72 Low-Producer, verursacht durch einen Polymorphismus in der kodierenden Sequenz des HSP 72-Gens, ein erhöhtes Risiko für akutes Nierenversagen aufweisen. HSP 72 spielt in unreifen Rattennieren eine entscheidende Rolle bei der Ischämietoleranz, eine weitere Studie zeigte einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einer Spitze in der HSP 72-Expression und dem Schutz von unreifen Tieren vor hypoxischen Nierenschäden.

Neben HSP 70 werden HSP 25 und HSP 90 nach renaler Ischämie als posttranslatinaler Repairmechanismus überexprimiert. Deshalb werden sie als weitere protektive Chaperone diskutiert. So spielt die Induktion von HSP 25 eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Aktinfilamente nach Zerstörung des Cytoskeletts nach renaler Ischämie. HSP 90 soll in Tierversuchen an Ratten nach renaler Ischämie die Rekompartimentierung der Na⁺/K⁺-ATPase in den Nierenkortex bewirken. Dies soll hauptsächlich durch die Interaktion mit HSP 72 oder HSP 25 ermöglicht werden.

Untersuchte Population

Untersucht werden neugeborene und pädiatrische Patienten bis zum Alter von 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie.

6.1.3 Ziel der Studie

Hypothese

Die Produktion von Hitzeschockproteinen hat einen Einfluss auf Entstehung und Outcome des akuten Nierenversagens bei Kindern.

Bedeutung

Sollte das Ergebnis der Studie einen Zusammenhang zwischen der Produktion von Hitzeschockproteinen und dem Outcome von Kindern bei akutem Nierenversagen nahelegen,

wären weitergehende Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung der HSP bei ANV (mechanistische Signifikanz oder lediglich Markerrolle) sowie zu möglichen neuartigen Therapieansätzen, die in die Produktion von HSP eingreifen, angezeigt. Ein Hochrisikokollektiv für die Entwicklung eines ANV wäre prospektiv definierbar mit deutlicher Verbesserung der Ausgangsbedingungen für therapeutische Studien. Daneben könnte eine Modulation des bisherigen therapeutischen Vorgehens dahingehend die Folge sein, dass bei so definierbaren Risikopatienten erhöhte Aufmerksamkeit auf die Vermeidung weiterer die Niere betreffende Insulte (z. B. potentiell nephrotoxische Medikamente) gelenkt werden müsste.

6.1.4 Design

Studienart

Die Studie ist eine Beobachtungsstudie, die als Fall-Kontroll-Studie einen »Proof of Principle« erbringen soll.

Studiengruppen

Die Patienten werden in die Fallgruppe »Entwicklung eines akuten Nierenversagens« und die Kontrollgruppe »Nichtentwicklung eines akuten Nierenversagens« aufgeteilt.

Einschlusskriterien

Einschlusskriterien sind Alter bis zu 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie. Sepsis und Schock werden anhand internationaler Konsensuskriterien definiert. Das ANV wird als Serumkreatininanstieg (Verdoppelung gegenüber dem Ausgangswert) und einer Abnahme des Urinvolumens unterhalb von 0,5 ml/kg KG/h oder eine um mindestens 50 Prozent reduzierte Kreatininclearance definiert. Die Beobachtung beginnt mit der Aufnahme der Patienten auf die Intensivstation.

Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien sind eine vorbestehende Nierenerkrankung oder Nierentransplantation. Das fehlende Einverständnis der Eltern oder eines gesetzlichen Betreuers gilt ebenfalls als Ausschlusskriterium.

Endpunkte

Endpunkte der Studie sind Entwicklung eines akuten Nierenversagens, die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens nach akutem Nierenversagen und Mortalität.

Fallzahl

Es sollen aus den Altersgruppen bis 1 Jahr, 1 bis 6 Jahre und 6 bis 18 Jahre jeweils mindestens 20 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die ein akutes Nierenversagen entwickeln. Die statistisch benötigte Fallzahl wird vom Institut für medizinische Informationsbearbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität berechnet.

Patientenrekrutierung

Patienten sollen im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, der Kinderklinik Dritter Orden München-Nymphenburg, der Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching, der Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg und der Kinderklinik Memmingen rekrutiert werden.

Dokumentation

Die Daten aller in die Studie eingeschlossenen Patienten werden in einer Datenbank gesammelt. Darin enthalten sind die Routineparameter der klinischen Überwachung auf der Intensivstation aus den Krankenakten der Patienten, sowie die Ergebnisse der für die Studie durchgeführten Untersuchungen. Die Daten werden sofort im Anschluss an die Behandlung des Kindes in die Datenbank eingegeben und zu diesem Zeitpunkt auf Vollständigkeit überprüft. Die Auswertung der Daten erfolgt nach Abschluss der Rekrutierung am Ende der Studie. Alle außergewöhnlichen Ergebnisse und Ereignisse werden in der Datenbank notiert und kommentiert.

Ausscheiden aus der Studie

Patienten scheidern nur dann aus der Studie aus, wenn sie oder ihre Eltern oder ihr gesetzlicher Betreuer die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie widerruft.

Follow Up

Die Patienten werden beobachtet, bis sie entweder von der Intensivstation auf eine Normalstation verlegt werden oder verstorben sind. Beide Ereignisse werden in der Dokumentation notiert.

Datensammlung und -auswertung

Die Daten werden fortlaufend gesammelt und direkt nach dem Eingang vom Studienpersonal in der Datenbank archiviert. Die Auswertung erfolgt unter Mitarbeit des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann.

6.1.5 Untersuchungen

Probengewinnung

Der Urin wird aus 24-Stunden-Sammelurin gewonnen, der bei den Patienten ohnehin gesammelt wird. Die Blutproben werden gemeinsam mit den routinemäßigen Blutproben bei der Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation bzw. bei der ersten routinemäßigen Blutprobe auf der Intensivstation mit abgenommen. Das Blutplasma für die Bestimmung des HSP-Spiegels im Plasma wird gemeinsam mit der ersten routinemäßigen Blutprobe innerhalb der ersten 24 Stunden nach Erkrankungsbeginn abgenommen. Die 2 Milliliter EDTA-Blut (0,5ml bei Säuglingen) zur molekulargenetischen Untersuchung des Producer-Status werden mit der nächsten routinemäßigen Blutprobe vor der eventuellen Gabe eines Erythrozytenkonzentrates abgenommen.

Blut

Qualitative und Quantitative Bestimmungen Das vom Patienten entnommene Blut wird auf das Vorkommen von Hitzeschockproteinen untersucht. Zusätzlich werden im Blut Routineparameter wie Kreatinin, Albumin, Elektrolyte und Eiweiß im Plasma gemessen, um Anhaltspunkte für die Rahmenbedingungen der Blutentnahme gewinnen zu können.

Molekulargenetische Untersuchung Diagnostisch untersucht wird der genetische Producer-Status der Studienpatienten für die Hitzeschockproteine, hier insbesondere HSP 72. Aus den aus dem entnommenen Blut gewonnenen Zellen wird das Genom des Patienten auf den Polymorphismus für die Produktion des Hitzeschockproteins 70, also den eventuellen Low-Producer-Status, untersucht.

Urin

Der vom Patienten gewonnene Urin wird auf das Vorkommen von Hitzeschockproteinen untersucht. Zusätzlich werden auch hier Routineparameter bestimmt.

6.1.6 Patientensicherheit

Freiwilligkeit

Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der Schwere und Akutheit des Krankheitsbildes die Patienten bei Studieneintritt nicht aufklärungs- und zustimmungsfähig sind. Die Zustimmung der Eltern bzw. des Betreuers ist notwendig. Bei Erreichen eines entsprechenden Bewusstseinszustandes werden die Patienten altersgemäß aufgeklärt und ihr Einverständnis zusätzlich zum Einverständnis der Eltern bzw. des Betreuers eingeholt. Der schriftliche Einwilligungserklärung geht ein ärztliches Aufklärungsgespräch und die Aushändigung schriftlicher Informationen voraus. Sowohl die Patienten selbst, als auch die Eltern oder der gesetzliche Betreuer können jederzeit ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie ohne Angabe von Gründen widerrufen.

Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgt im Rahmen der klinischen Routinediagnostik der Patienten. Es entstehen dadurch somit keine zusätzlichen Risiken. Die abgenommene Blutmenge wird bei Neugeborenen auf ein Minimum beschränkt, so dass nach Beurteilung der jeweils betreuenden Ärzte kein zusätzliches Risiko für die Patienten eingegangen wird.

Untersuchungen

Es werden für die Studie keine zusätzlichen Untersuchungen am Patienten durchgeführt. Alle Untersuchungen finden an den vom Patienten gewonnenen Geweben (also Blut und Urin) statt.

Beobachtung/Follow Up

Die Beobachtung der Patienten erfolgt vom Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation bis zur Verlegung auf eine Normalstation oder bis zum Tod des Patienten.

Ausscheiden aus der Studie

Teilnehmende Patienten scheidet nur auf eigenen Wunsch aus der Studie aus. Ein Ausschließen durch die Studienleitung findet nicht statt. Sollten Gewebe, Daten oder Untersuchungsergebnisse nicht gewonnen werden können oder verfügbar sein, wird dies in der Studiendatenbank vermerkt und kommentiert.

6.1.7 Statistik

Fallzahlberechnung

Die Fallzahlberechnung erfolgt durch das Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann. Die Fallzahlberechnung ist derzeit noch nicht abgeschlossen. Die Studienleitung rechnet mit einer minimalen Fallzahl von 60 Patienten mit entwickeltem akuten Nierenversagen.

Ende der Studie

Die Studie endet nach Erreichen der notwendigen Fallzahl oder vier Jahre nach Studienbeginn, falls absehbar ist, dass die notwendige Fallzahl nicht innerhalb des fünften Studienjahres erreicht werden kann.

Datenüberprüfung

Die Überprüfung der Daten obliegt der Studienleitung und dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann.

Datenbereinigung

Eine Datenbereinigung findet nach der Überprüfung der Daten statt, um die Daten statistisch auswerten zu können.

Einschluss in die Auswertung

Alle erhobenen Daten werden ausgewertet.

Datenschutz

Alle im Rahmen der HSP-Studie erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Patientendaten aus der Krankenakte und die zugehörigen Untersuchungsergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert. Die Auswertung dieser Daten erfolgt pseudonymisiert. Zur Pseudonymisierung wird ein Verfahren verwendet, das nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser eine Zuordnung der erfassten Daten zu einzelnen Patienten ermöglicht. Diese Zuordnung erfolgt nur, wenn die Klärung einer während der Studie auftretenden wissenschaftlichen Fragestellung dies erforderlich macht. Auch in diesen Fällen werden die Daten ausschließlich pseudonymisiert und ohne Bezug zu einer bestimmten Person an Dritte, die an der Auswertung der Studie beteiligt sind, weitergegeben. Auch in etwaigen Veröffentlichungen erscheinen Daten dieser klinischen Studie ausschließlich pseudonymisiert.

Speicherung der Daten Die in der Studie erhobenen Daten zur Person des Probanden und in der Studie erhobene Befunde werden in einem Computersystem (Original) und auf einem Datenträger (erstes Backup), sowie auf einem zusätzlichen Datenträger (zweites Backup) für den Fall eines Datenverlustes kennwortgeschützt gespeichert. Hierzu wird eine kennwortgeschützte Studiendatenbank (Studien-DB) angelegt. Sie ist nur für die Studienleiter Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und den medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglich. Zusätzlich erfolgt ein ständig aktualisierter Ausdruck, der für den Fall eines kompletten Datenverlustes an einem nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglichen Ort verschlossen aufbewahrt wird.

Pseudonymisierung Die Pseudonymisierung erfolgt mittels eines numerischen Verschlüsselungscode, in dem weder die exakten Initialen, noch das Geburtsdatum oder sonstige personenbezogene Merkmale aufscheinen. Die Probanden werden beginnend bei 1 durchnummeriert. Der Personenbezug der Daten wird sofort nach der Aufnahme des Probanden

in die Studie aufgehoben. Hierzu wird bei der Aufnahme in die Studie das erste Blatt des zum Probanden gehörenden Protokolls vom Rest des Protokolls getrennt. Nur diese Seite enthält die Personendaten des Probanden und die Zuordnung, welches Pseudonym (Identifizierung, ID) der Proband in der Studie trägt. Die Daten dieses Blattes werden in eine kennwortgeschützte Pseudonymisierungsdatenbank (Pseudonym-DB) übernommen, das Blatt anschließend in einem wie oben beschrieben gesicherten Ordner abgeheftet. Von da an ist der Personenbezug der Daten nur durch Zugang zur Pseudonym-DB oder zum gesicherten Ordner möglich, welcher den Studienleitern und dem medizinischen Doktoranden vorbehalten ist.

Zugriff auf Studiendaten

Studienleitung und beteiligte Personen Die Studienleitung (Prüfärzte) besteht aus Frau Dr. med. Judith Glöckner-Pagel und Herrn Dr. Karl Reiter. Direkt an der Studie beteiligt ist der medizinische Doktorand Dennis Ballwieser. Alle drei Personen (und nur diese drei Personen) haben Zugriff sowohl auf die Studiendatenbank, als auch auf die Pseudonymisierungsdatenbank.

IBE Die Mitarbeiter des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie haben ausschließlich Zugriff auf die Studiendatenbank, nicht aber auf die Pseudonymisierungsdatenbank.

Qualitätskontrolle

Die Kontrolle der korrekten Durchführung der Untersuchungen, unverzüglichen Datenspeicherung, der Einhaltung der gesetzlichen und ethischen Normen, sowie der Aktualisierung der Studieninformationen im Internetportal ClinicalTrials.gov obliegt der Studienleitung und wird regelmäßig, mindestens halbjährlich, schriftlich festgehalten.

Ethik

Ein Antrag auf Beurteilung der klinischen Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Vorsitz von Herrn Prof. Dr. med. Gustav Paumgartner wurde am 24.8.2005 eingereicht. Mit Datum vom 19.9.2005 erhielten wir die Zuerkennung der ethisch-rechtlichen Unbedenklichkeit, insofern die Patienteninformation in drei Punkten überarbeitet wurde, was zum 28.9.2005 erfolgt ist. Laut Schreiben der Ethikkommission erhebt diese keine grundsätzlichen ethisch-rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie. Die HSP-Studie trägt bei der Ethikkommission die Projektnummer 233-05.

Finanzierung

Im Zusammenhang mit der Studie wurde ein Antrag an das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München ge-

stellt. Drittmittel decken die Kosten, die durch diese Studie entstehen.

Versicherung

Alle klinischen Verfahren sind als Standardverfahren der alltäglichen klinischen Routineuntersuchung einzustufen. Schäden, die aus der Behandlung mit diesen Verfahren entstehen, sind deshalb durch das Land Bayern als Dienstherrn der ausführenden Ärzte versichert.

Publikation

Nach dem Ende der Studie werden die Ergebnisse in einer medizinischen Fachzeitschrift veröffentlicht. Die Dissertation des an der Studie beteiligten medizinischen Doktoranden wird gemäß der Promotionsordnung für die medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München ebenfalls veröffentlicht.

Anhang

Antrag auf Beurteilung einer klinischen Studie durch die Ethikkommission

Information zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)

6.2 Ethikantrag

Im Folgenden wird der Wortlaut des *Antrags an die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Beurteilung der klinischen Studie zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)* in der revidierten Fassung vom 28.9.2005 wiedergegeben, der von der Ethikkommission mit dem Ethikvotum vom 19.9.2005 unter Vorbehalt der Änderung der Patienteninformation genehmigt wurde. Der Autor dieser Dissertation war an der Erstellung des Ethikantrags inhaltlich maßgeblich beteiligt.

6.2.1 Formalia

Antragsteller

Dr. med. Judith-Glöckner-Pagel

Dr. med. Karl Reiter

Dr. von Haunersches Kinderspital

Lindwurmstr. 4

80337 München

Telefon: 0 89 / 51 60 - 28 11

E-Mail: judith.gloeckner@med.uni-muenchen.de oder karl.reiter@med.uni-muenchen.de

Titel des Forschungsvorhabens

Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie).

Ausbildungsdaten und Prüferfahrung der Antragsteller

Dr. med. Judith Glöckner-Pagel ist Ärztin und befindet sich seit 2003 in der Weiterbildung zum Facharzt der Kinderheilkunde. Vor dem Beginn der Facharztausbildung arbeitete sie zwei Jahre als Postdoc im Department of Molecular and Cellular Physiology der Yale University, New Haven, USA. Im Dezember 2004 begann sie, ihre eigene wissenschaftliche Arbeitsgruppe im Dr. von Haunerschen Kinderspital aufzubauen.

Dr. med. Karl Reiter ist seit 1996 Facharzt für Kinderheilkunde und seit 1998 Oberarzt der pädiatrischen Intensivstation. Zu Studienaufenthalten befand er sich 1997 am Children's Hospital in Los Angeles (pädiatrische Intensivmedizin) und 2001 an der nephrologischen Abteilung in Vicenza bei Professor Ronco (Hämofiltration in der Intensivmedizin). Prüferfahrung wurde durch die Teilnahme an folgenden Studien gewonnen: Surfactant bei pädiatrischem ARDS; polymixinbeschichtete Haemofilter in der Behandlung der schweren Sepsis; aktiviertes Protein C bei schwerer Sepsis im Kindesalter; Clonidin zur Analgosedierung bei pädiatrischen Intensivpatienten.

Multizenterstudie

Die Studie ist als Multizenterstudie geplant. Unter anderem sollen die Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching, die Kinderklinik des Krankenhauses Dritter Orden München Nymphenburg, die Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg und die Kinderklinik Memmingen für die Studie gewonnen werden.

Schriftliche Zustimmung des verantwortlichen Leiters der klinischen Einrichtung

Die Zustimmung des Direktors des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, Prof. Dr. Dietrich Reinhardt, liegt bei (siehe Anlage).

Finanzierung

Im Zusammenhang mit der Studie wurde ein Antrag an das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Universität München gestellt. Drittmittel decken die Sekundärkosten, die durch zusätzliche Labordiagnostik entstehen. Durch die Studie werden keine verlängerten stationären Aufenthalte bedingt.

Versicherungsschutz für Probanden

Alle klinischen Verfahren sind als Standardverfahren der alltäglichen klinischen Routineuntersuchung einzustufen. Schäden, die aus der Behandlung mit diesen Verfahren entstehen, sind deshalb durch das Land Bayern als Dienstherren der ausführenden Ärzte versichert.

Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki

Die Planung, Durchführung und Auswertung der Studie zur »Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)« wird unter Beachtung der Grundsätze der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (1964) mit ihren Novellierungen von Tokio (1975), Hong Kong (1989), Sommerset West (1996) und Edinburgh (2000) vorgenommen.

6.2.2 Spezielle Angaben zum Forschungsvorhaben

Fragestellung

Hypothese Die Produktion von Hitzeschockproteinen hat einen Einfluss auf Entstehung und Outcome des akuten Nierenversagens bei Kindern.

Ziele Aufbauend auf den im Folgenden beschriebenen Hintergründen wollen wir untersuchen, ob bei pädiatrischen Patienten mit Sepsis und/oder Ischämie-/Reperfusionsschäden im Rahmen eines Schocks der genetische Polymorphismus eines Low-Producer-Status für HSP 72 einen prognostischen Faktor in der Entstehung des akuten Nierenversagens darstellt, die Hitzeschockproteine HSP 72, HSP 90 und HSP 25 im Urin nachweisbar sind, die Ausscheidung dieser Hitzeschockproteine im Urin einen protektiven Faktor darstellt und die Urinausscheidung von HSP 72 mit einem erhöhten Blutspiegel von HSP 72 korreliert.

Bedeutung Ein zuverlässiger prognostischer Faktor für die Entwicklung des akuten Nierenversagens (ANV) bei schwer kranken Kindern ist nicht verfügbar und wäre von großem Wert als Steuerungsinstrument in der Therapie. Chaperone aus der Familie der Hitzeschockproteine sind aussichtsreiche Kandidaten, die zugleich eine bedeutsame pathophysiologische Rolle in der Entstehung des ANV spielen und damit einen Ansatz für die Entwicklung neuer Therapieansätze bieten könnten.

Ein akutes Nierenversagen tritt bei bis zu 50 Prozent aller kritisch kranken pädiatrischen Patienten auf und zeigt trotz Fortschritten in der symptomatischen Behandlung nach wie vor eine hohe Morbidität und Mortalität. Kommt es im Gefolge einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks wie auch bei Schockformen anderer Ursache zu einem Multiorganversagen, so stellt das Auftreten eines akuten Nierenversagens einen unabhängigen prognoseverschlechternden Faktor dar.

Hintergrund In der Mehrzahl der Fälle liegt dem akuten Nierenversagen ein renaler Ischämie-/Reperfusionsschaden zugrunde. Die Reaktion der Niere auf Ischämie/Reperfusion ist vielfältig. Persistierende Vasokonstriktion, tubuläre Obstruktion, zelluläre strukturelle und metabolische Veränderungen sowie inflammatorische Reaktionen sind pathogenetische Komponenten.

Protektive Faktoren, die ein ANV verhindern oder beeinflussen können, sind wenig untersucht. Hitzeschockproteine spielen unter anderem eine gut untersuchte Rolle in der Sta-

bilisierung des Aktinzytoskeletts, so dass sie als protektive Faktoren bei ANV in Frage kommen.

Hitzeschockproteine sind eine Gruppe ubiquitär vorkommender zytoplasmatischer Zellproteine. Ihre Isoformen stellen bis zu fünf Prozent aller zellulären Proteine im Normalzustand und können bei Stress um bis zu 20 Prozent ansteigen. Die HSP-Produktion wird durch verschiedene zelluläre Stressoren wie Hitze, UV-Licht oder zytotoxische Agenzien angeregt. Alle Stoffe, die HSP induzieren, haben proteinschädigende Eigenschaften, die zu erhöhten zellulären Konzentrationen denaturierter Proteine führen.

Der durch HSP vermittelte Zellschutz wird durch die Stabilisierung des Zytoskeletts und die Chaperon-Funktion der HSP erreicht. Bei der renalen Ischämie wird das Aktinzytoskelett der tubulären Zellen zerrissen. HSP kommen in verschiedenen Nierenkompartimenten vor und werden bei renaler Ischämie angehäuft. Eine Rolle der HSP bei der Erholung von ischämieinduzierten Aktinfilamentrissen wird angenommen. Die Rolle der HSP bei zellulären Reparaturprozessen ist noch nicht vollständig verstanden. HSP wirkt unterdrückend auf Signalproteine, die an der Apoptose beteiligt sind. Werden Medullazellen der Niere verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, steigt die HSP-Expression, verbunden mit besseren Überlebensraten der Zellen, wenn sie erneut Stress ausgesetzt wurden. Eine erste Untersuchung zeigte signifikant erhöhte Plasmaspiegel von HSP 70 bei Kindern mit septischem Schock. Untersuchungen zur Funktion und klinischen Relevanz von extrazellulärem HSP 70 bei Sepsis stehen aus.

In Tierversuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass nur bei renaler Ischämie HSP 72 im Urin ausgeschieden wird, nicht aber bei Hyperthermie. Bei nierentransplantierten Kindern konnte HSP 72 innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Transplantation im Urin nachgewiesen werden. Im Urin pädiatrischer Patienten mit stabilen oder mit chronischen Nierenerkrankungen war dagegen kein HSP 72 nachweisbar. Im Urin nachweisbares HSP 72 könnte ein Hinweis auf eine Stressreaktion und Verlust der Tubuluszellintegrität sein. Andere Studienergebnisse legen nahe, dass ein erhöhter Grundspiegel an HSP 72 bei Ratten einen Resistenzfaktor gegen renale Ischämie darstellen könnte.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass genetisch bedingte HSP 72-Low-Producer, verursacht durch einen Polymorphismus in der kodierenden Sequenz des HSP 72-Gens, ein erhöhtes Risiko für akutes Nierenversagen aufweisen. HSP 72 spielt in unreifen Rattennieren eine entscheidende Rolle bei der Ischämietoleranz, eine weitere Studie zeigte einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einer Spitze in der HSP 72-Expression und dem Schutz von unreifen Tieren vor hypoxischen Nierenschäden.

Neben HSP 70 werden HSP 25 und HSP 90 nach renaler Ischämie als posttranslatinaler Repairmechanismus überexprimiert. Deshalb werden sie als weitere protektive Chaperone diskutiert. So spielt die Induktion von HSP 25 eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Aktinfilamente nach Zerstörung des Cytoskeletts nach renaler Ischämie. HSP 90 soll in Tierversuchen an Ratten nach renaler Ischämie die Rekompartimentierung der Na⁺/K⁺-ATPase in den Nierenkortex bewirken. Dies soll hauptsächlich durch die Interaktion mit HSP 72 oder HSP 25 ermöglicht werden.

Arbeitsprogramm In die Studie werden alle Neugeborenen und pädiatrischen Patienten bis zum Alter von 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie eingeschlossen.

Sepsis und Schock werden anhand internationaler Konsensuskriterien definiert. Das ANV wird als Serumkreatininanstieg (Verdoppelung gegenüber dem Ausgangswert) und eine Abnahme des Urinvolumens unterhalb von 0,5ml/kg KG/h oder eine um mindestens 50 Prozent reduzierte Kreatininclearance definiert.

Jeweils etwa 20 Patienten mit ANV der Altersklassen 0 bis 1 Jahr, 1 bis 6 Jahre und 6 bis 18 Jahre sollen in die Studie eingeschlossen werden. Patienten sollen im Dr. von Hauernschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, der Kinderklinik des Klinikums Dritter Orden München-Nymphenburg, der Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching, der Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg und der Kinderklinik Memmingen rekrutiert werden. bei den Patienten in der Studiengruppe werden zwei Outcome-Gruppen festgelegt, die über Entwicklung und Nichtentwicklung eines ANV definiert sind. Bei den Patienten der Studiengruppe wird am Aufnahmetag die Bilanzierung des Urins begonnen und alle zwölf Stunden von einem Sammelurin eine Urinprobe entnommen. Die Urinprobe wird ohne vorherige Zentrifugation bei -80°C aufbewahrt. Die Entnahme der Urinprobe erfolgt bei Intensivpatienten mit Entwicklung eines ANV solange, bis sich das Serumkreatinin wieder normalisiert hat. Weiterhin werden aus jeder Urinprobe die Routineparameter der glomerulären und tubulären Funktion (Kreatinin, Albumin, Eiweiß, alpha1-Mikroglobulin, Elektrolyte) bestimmt.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Erkrankungsbeginn wird eine Blutprobe zur Bestimmung des HSP-Plasmaspiegels im Serum gewonnen. Weiterhin wird im Verlauf des stationären Aufenthalts bei Patienten und Kontrollen 2 Milliliter EDTA-Blut (bei Neugeborenen 0,5ml) zur molekulargenetischen Untersuchung des Polymorphismus des Low-Producer-Status von HSP 72 abgenommen, was in jedem Fall vor der eventuellen Gabe eines Erythrozytenkonzentrates erfolgen muss. Sollte eine Gewinnung der Blutprobe vor Gabe eines Erythrozytenkonzentrates nicht möglich sein, kann auch ein Abstrich der Wangenschleimhaut erfolgen, aus welchem die molekulargenetische Bestimmung des HSP 72-Polymorphismus durchgeführt werden kann. In derselben Blutentnahme werden zusätzlich Routineparameter wie Kreatinin, Albumin, Elektrolyte und Eiweiß im Plasma gemessen.

Diagnostische Untersuchungen

Urin Bestimmung der HSP 72, 90, 25 im Zwölf-Stunden-Sammelurin mittels Western-Blot/ELISA. Bestimmung von Kreatinin, Albumin, Eiweiß, Elektrolyten und alpha1-Mikroglobulin in unserem klinischen Routinelabor.

Blut Bestimmung der Serumkonzentration von HSP 72 mittels Western-Blot. Genetische Analyse auf das Vorliegen der Punktmutation A1267G im HSP 72-Gen mittels Restriktionsenzymassays (RFLP). Bestimmung von Kreatinin, Albumin, Elektrolyten und Eiweiß in unserem klinischen Routinelabor.

Art der Studie

Die Studie ist als Fallkontrollstudie konzipiert. Es handelt sich bei unserer Studie um eine »Proof-of-Principle«-Studie, mit der geklärt wird, ob weitere klinische Studien, die eventuell die Behandlungsschemata für akutes Nierenversagen bei Kindern beeinflussen, sinnvoll sind.

Den Studienpatienten entstehen durch die Gewebeentnahme für Studienzwecke, also Urin- und Blutproben, keine erhöhten Risiken im Vergleich zur Standardbehandlung bei akutem Nierenversagen. Der Urin wird aus dem 24-Stunden-Sammelurin gewonnen, der bei diesen Patienten ohnehin gesammelt wird.

Die Blutproben werden gemeinsam mit den routinemäßigen Blutproben bei der Aufnahme des Patienten auf die Intensivstation bzw. bei der ersten routinemäßigen Blutprobe auf der Intensivstation mit abgenommen. Das Blutplasma für die Bestimmung des HSP-Spiegels im Plasma wird gemeinsam mit der ersten routinemäßigen Blutprobe innerhalb der ersten 24 Stunden nach Erkrankungsbeginn abgenommen. Die 2 Milliliter EDTA-Blut zur molekulargenetischen Untersuchung des Producer-Status werden mit der nächsten routinemäßigen Blutprobe vor der eventuellen Gabe eines Erythrozytenkonzentrates abgenommen.

Diagnostisch untersucht wird der genetische Producer-Status der Studienpatienten für die Hitzeschockproteine, hier insbesondere HSP 72. Der diagnostische Nutzen für den Patienten ist Gegenstand der Fragestellung dieser Studie, weshalb im Vorhinein keine Aussage über den Nutzen für den Patienten getroffen werden kann.

Das vom Patienten entnommene Blut wird auf das Vorkommen von Hitzeschockproteinen untersucht. Aus den aus dem entnommenen Blut gewonnenen Zellen wird das Genom des Patienten auf den Polymorphismus für die Produktion des Hitzeschockproteins 70, also den eventuellen Low-Producer-Status, untersucht. Zusätzlich werden im Blut Routineparameter wie Kreatinin, Albumin, Elektrolyte und Eiweiß im Plasma gemessen, um Anhaltspunkte für die Rahmenbedingungen der Blutentnahme gewinnen zu können. Der vom Patienten gewonnene Urin wird auf das Vorkommen von Hitzeschockproteinen untersucht.

Alle Ergebnisse der Untersuchungen zu Studienzwecken werden nur für die Studie verwendet und nicht an Dritte weitergegeben. Nicht für die Studie verwendete Reste der Patientenproben werden nach Ende der Studie vernichtet.

Studiendesign

Die Studie ist eine als Fallkontrollstudie konzipierte »Proof-of-Principle«-Studie. Das genaue Studienprotokoll liegt bei (siehe Anhang).

Folgende Untersuchungen werden durchgeführt, sobald der Patient mit der Diagnose Sepsis, Asphyxie oder Schock auf die Intensivstation aufgenommen wurde:

1. Alle zwölf Stunden Entnahme einer Urinprobe aus dem Sammelurin zur Bestimmung sowohl der HSP-Konzentration, als auch von Kreatinin, Albumin, Eiweiß, Elektrolyten und alpha1-Mikroglobulin solange der Patient auf der Intensivstation liegt.

2. Entnahme von einmalig 2 Milliliter EDTA-Blut zur DNA-Aufreinigung, um den HSP

72-Polymorphismus zu untersuchen.

3. Übernahme der Daten der routinemäßigen Bestimmung von Kreatinin, Albumin, Elektrolyten und Eiweiß während des Aufenthalts auf der Intensivstation.

4. Zusätzliche Blutentnahme von 0,5 Milliliter Serum im Rahmen der Routineblutabnahme auf der Intensivstation zur Bestimmung von HSP 72 im Serum.

5. Täglich klinische Untersuchung.

Kontrolluntersuchungen sind nicht geplant. Ergeben sich aus den Befunden therapeutische Maßnahmen, so folgen diese den allgemein anerkannten Richtlinien.

Die Studie wird begleitet vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mansmann.

Ethisch-rechtlich relevante Probleme der Studie Es sind keine Nebenwirkungen bei den geplanten Untersuchungen zu erwarten. Es bestehen damit für den Patienten keine zusätzlichen Risiken. Somit ergeben sich aus unserer Sicht keine ethisch-rechtlichen Bedenken.

Wesentliche Angaben zum Studiendesign

Einschlusskriterien Neugeborene und pädiatrische Patienten bis zum Alter von 18 Jahren mit schwerer Sepsis, Schock jedweder Genese oder Asphyxie.

Ausschlusskriterien Eine vorbestehende renale Beeinträchtigung oder das fehlende Einverständnis der Eltern gelten als Ausschlusskriterium.

Rekrutierung Patienten mit Sepsis, Asphyxie oder Schock jedweder Genese der Altersklassen 0 bis 1 Jahr, 1 bis 6 Jahre und 6 bis 18 Jahre sollen in die Studie eingeschlossen werden. Patienten sollen im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, der Kinderklinik Dritter Orden München-Nymphenburg, der Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching, der Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg und der Kinderklinik Memmingen rekrutiert werden.

Anzahl der Patienten Es wird angestrebt, mindestens 80 Patienten zu rekrutieren.

Beginn und Dauer der Studie Die Rekrutierung soll im Herbst 2005 beginnen. Geplantes Ende ist je nach Erreichen der Patientenzahlen etwa im Winter 2007/Frühjahr 2008.

Abbruchkriterien Da die Studie rein beobachtenden Charakter hat, gibt es keine Notwendigkeit, sie vor Erreichen der für eine statistisch belastbare Aussage notwendigen Fallzahl abzubrechen.

Weiteres Vorgehen, wenn ein Patient aus der Studie ausscheidet oder ausscheiden muss Das Ausscheiden wird mit Zeitpunkt der Feststellung und klinischen Befunden zum Zeitpunkt der Feststellung auf dem Studiendokumentationsbogen des Patienten festgehalten.

Dokumentation und geplante Zwischenauswertung Die Untersuchungen werden auf dem Untersuchungsprotokoll und in der Patientenakte dokumentiert. Die Ergebnisse eines jeden Patienten werden zügig nach dem Vorliegen in eine Datenbank übernommen und auf Vollständigkeit überprüft. Die Ergebnisse des Gesamtkollektivs werden nach Abschluss der Studie analysiert und ausgewertet.

Zusammensetzung des unabhängigen Beratergremiums Ein unabhängiges Beratungsgremium ist aufgrund des rein beobachtenden Charakters der Studie nicht notwendig.

Zustimmungsfähigkeit des Patienten

Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der Schwere und Akutheit des Krankheitsbildes die Patienten bei Studieneintritt nicht aufklärungs- und zustimmungsfähig sind. Die Zustimmung beider Eltern bzw. des Betreuers ist notwendig. Bei Erreichen eines entsprechenden Bewusstseinszustandes werden die Patienten altersgemäß aufgeklärt und ihr Einverständnis zusätzlich zum Einverständnis der Eltern bzw. des Betreuers eingeholt.

Die Frage der Bedeutung der Hitzeschockproteine als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern ließe sich nicht beantworten, wenn nur Volljährige an der Studie teilnähmen.

Honorierung von Patienten

Eine Honorierung von Patienten oder deren gesetzlicher Vertreter für die Teilnahme an der Studie ist nicht vorgesehen.

Versicherung

Unsere Studie fällt weder unter das Arzneimittelgesetz, noch unter das Medizinproduktegesetz. Eventuell entstehende Schäden durch die Routineverfahren, die zur Standardbehandlung der Patienten gehören, sind durch das Land Bayern als Dienstherren der ausführenden Ärzte versichert. Es ist keine zusätzliche verschuldungsunabhängige Personenschadensversicherung notwendig.

Datenschutz

Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden entsprechend der Forderungen der einschlägigen rechtlichen Bestimmungen vertraulich behandelt. Die ärztliche Schweigepflicht bleibt durch die Teilnahme an der Studie unberührt. Allerdings können nicht personenbezogene Daten nach Einwilligung des Patienten bzw. dessen gesetzlichen Vertreters in

ausschließlich pseudonymisierter Form durch Personen, die an der Überwachung des Studienablaufs, sowie an der Auswertung der Ergebnisse beteiligt sind, eingesehen werden. Es werden keine individualisierten Daten weitergegeben.

Alle im Rahmen der HSP-Studie erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Patientendaten aus der Krankenakte und die zugehörigen Untersuchungsergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert. Die Auswertung dieser Daten erfolgt pseudonymisiert. Zur Pseudonymisierung wird ein Verfahren verwendet, das nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser eine Zuordnung der erfassten Daten zu einzelnen Personen ermöglicht. Diese Zuordnung erfolgt nur, wenn die Klärung einer während der Studie auftretenden wissenschaftlichen Fragestellung dies erforderlich macht. Auch in diesen Fällen werden die Daten ausschließlich pseudonymisiert und ohne Bezug zu einer bestimmten Person an Dritte, die an der Auswertung der Studie beteiligt sind, weitergegeben. Auch in etwaigen Veröffentlichungen erscheinen Daten dieser klinischen Studie ausschließlich pseudonymisiert.

Die in der Studie erhobenen Daten zur Person des Probanden und in der Studie erhobene Befunde werden in einem Computersystem (Original) und auf einem Datenträger (erstes Backup), sowie auf einem zusätzlichen Datenträger (zweites Backup) für den Fall eines Datenverlustes kennwortgeschützt gespeichert. Hierzu wird eine kennwortgeschützte Studiendatenbank (Studien-DB) angelegt. Sie ist nur für die Studienleiter Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und den medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglich. Zusätzlich erfolgt ein ständig aktualisierter Ausdruck, der für den Fall eines kompletten Datenverlustes an einem nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglichen Ort verschlossen aufbewahrt wird.

Die Pseudonymisierung erfolgt mittels eines numerischen Verschlüsselungscode, in dem weder die exakten Initialen, noch das Geburtsdatum oder sonstige personenbezogene Merkmale aufscheinen. Die Probanden werden beginnend bei 1 durchnummeriert. Der Personenbezug der Daten wird sofort nach der Aufnahme des Probanden in die Studie aufgehoben. Hierzu wird bei der Aufnahme in die Studie das erste Blatt des zum Probanden gehörenden Protokolls vom Rest des Protokolls getrennt. Nur diese Seite enthält die Personendaten des Probanden und die Zuordnung, welches Pseudonym (Identifizierung, ID) der Proband in der Studie trägt. Die Daten dieses Blattes werden in eine kennwortgeschützte Pseudonymisierungsdatenbank (Pseudonym-DB) übernommen, das Blatt anschließend in einem wie oben beschrieben gesicherten Ordner abgeheftet. Von da an ist der Personenbezug der Daten nur durch Zugang zur Pseudonym-DB oder zum gesicherten Ordner möglich, welcher den Studienleitern und dem medizinischen Doktoranden vorbehalten ist.

Patienten-/Probandeninformation und Einverständniserklärung

Beide Dokumente liegen diesem Antrag bei (siehe Anlage).

Schwerwiegende oder unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie

Sollten schwerwiegende oder unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie auftreten, werden diese umgehend von der Studienleitung der Ethikkommission mitgeteilt.

Änderungen des Studienprotokolls

Sollte es Änderungen des Studienprotokolls geben, werden diese umgehend von der Studienleitung der Ethikkommission mitgeteilt.

Aufwandsentschädigung

Die Antragsteller werden nach Erhalt von Rechnung und Buchungskennzeichen die Aufwandsentschädigung entrichten.

6.2.3 Anlagen

Studienprotokoll

Patienten-/Probandeninformation und Einverständniserklärung

6.3 Ethikvotum

Im Folgenden wird der Wortlaut des in Abbildung 6 faksimilierten Schreibens des Vorsitzenden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Zeitpunkt des Ethikantrages, Prof. Dr. Gustav Paumgartner, vom 29.09.2005 wiedergegeben:

Sehr geehrte Frau Kollegin Glöckner-Pagel,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 28.09.2005 mit der Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK-Antrag, Studienprotokoll, Information für Eltern, Einwilligungserklärungen).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Sie werden gebeten, die EK über alle schwerwiegenden oder unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie zu unterrichten.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. G. Paumgartner Vorsitzender der Ethikkommission

Ethikkommission der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität
Vorsitzender: Prof. Dr. Gustav Paumgartner

_____ **LMU**
Ludwig-_____
Maximilians-_____
Universität_____
München, 15_____
81377 München
Tel: (089) 7095 4609
Fax: (089) 7095 7609
e-mail: Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de
29.09.2005

Klinikum der Universität München – Großhadern
Marchioninstr. 15 81377 München

Frau
Dr. J. Glöckner- Pagel
Dr. v. Haunersches Kinderspital
Lindwurmstr. 4

80337 München

Projekt Nr. 233-05
Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten
Nierenversagens bei Kindern (HSP- Studie)

Sehr geehrte Frau Kollegin Glöckner- Pagel,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 28.09.2005 mit der Erfüllung der Auflagen und den
noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, Studienprotokoll,
Information für Eltern, Einwilligungserklärungen).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit
zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des
Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung
des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Sie werden gebeten, die EK über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse im
Rahmen der Studie zu unterrichten.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.
Mit freundlichen Grüßen

J. Paumgartner
Prof. Dr. G. Paumgartner
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. G. Paumgartner (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. H. U. Gailwas,
Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, PD Dr. V. Nüßler, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer

PKA 325 00150

001/002 P001/002 13 Mär 2007 4:38 Fax: +49-89-51604408 KUM PPS

Abbildung 6: Faksimile des Schreibens des Ethikkommissionsvorsitzenden vom 28.09.2005.

6.4 Patienteninformation

Im Folgenden wird der Wortlaut der *Information zur Untersuchung von Hitzeschockproteinen als prognostischer Faktor des akuten Nierenversagens bei Kindern (HSP-Studie)* in der revidierten Fassung vom 28.9.2005 wiedergegeben, der von der Ethikkommission mit dem Ethikvotum vom 19.9.2005 unter Vorbehalt der Änderung der ursprünglich eingereichten Patienteninformation genehmigt wurde. Der Autor dieser Dissertation war an der Erstellung der Patienteninformation inhaltlich maßgeblich beteiligt.

6.4.1 Deutsche Version

Liebe Eltern, in diesem Schreiben geben wir Ihnen wichtige Informationen über die Studie, in die wir Ihr Kind gerne einschließen möchten. Bitte lesen Sie die aufgeführten Punkte sorgfältig durch und wenden Sie sich bei Fragen entweder an Frau Dr. Judith Glöckner-Pagel oder Herrn Dr. Karl Reiter, die Prüffärzte unserer Studie. Sie finden ihre Kontaktdaten am Ende dieser Information.

Das Ziel der Studie

In unserer Studie soll untersucht werden, ob bestimmte Eiweiße im Körper, die so genannten Hitzeschockproteine (HSP), den Verlauf des akuten Nierenversagens bei Kindern beeinflussen. Unsere Vermutung ist, dass Patienten, die große Mengen an Hitzeschockproteinen bilden, entweder kein Nierenversagen entwickeln oder das akute Nierenversagen besser überstehen, als solche, die weniger Hitzeschockproteine bilden.

Hintergrund unserer Forschung

Einige schwer kranke Patienten im Kindesalter entwickeln ein akutes Nierenversagen. Obwohl die Krankheit intensiv behandelt wird, kann sie immer wieder schwer verlaufen, schlimmstenfalls verstirbt der Patient an ihren Folgen. Medizinische Wissenschaftler sind auf der Suche nach Schutzfaktoren, die das akute Nierenversagen verhindern oder zumindest den Verlauf abschwächen könnten. Die von uns untersuchten Hitzeschockproteine gelten als aussichtsreiche Kandidaten, solche so genannte protektive Faktoren zu sein. Bisher gibt es aber kaum Untersuchungen zum Auftreten der Hitzeschockproteine bei Kindern mit akutem Nierenversagen.

Der Körper produziert Hitzeschockproteine immer dann, wenn Zellen in Stress geraten. Durch die Hitzeschockproteine überstehen die Zellen den Stress besser. Wir wissen bereits, dass Kinder mit einem septischen Schock, der Stress für die Zellen bedeutet, deutlich mehr Hitzeschockproteine im Blut haben, als normalerweise. Auch bei Kindern, die eine Niere transplantiert bekamen, wurden die Hitzeschockproteine bereits untersucht. Sie konnten bei diesen Patienten im Urin gefunden werden. Möglicherweise ist das ein Zeichen für von Nierenzellen produzierte Hitzeschockproteine. Von Untersuchungen an Ratten wissen Forscher, dass Tiere mit grundsätzlich höheren Blutspiegeln an Hitzeschockproteinen Stress an Nierenzellen besser überstehen, als Ratten mit normalen Blutspiegeln.

Was wir untersuchen

Alle Kinder, die wir in unsere Studie einschließen, werden auf der Intensivstation behandelt. Bei der Aufnahme auf die Intensivstation und in regelmäßigen Abständen während des Aufenthaltes wird ihnen dort Blut für Routineuntersuchungen zur Überwachung der Körperfunktionen abgenommen. Kindern, die an der HSP-Studie beteiligt werden, nehmen wir während der Routineblutabnahmen zusätzlich wenige Milliliter Blut ab, um es für unsere Studie zu untersuchen.

Von Patienten, die ein akutes Nierenversagen entwickeln könnten oder bereits entwickelt haben, wird außerdem der Urin gesammelt, um ihn in 24-Stunden-Einheiten beurteilen zu können. Aus diesem so genannten 24-Stunden-Sammelurin entnehmen wir nach der Beurteilung durch den behandelnden Arzt alle zwölf Stunden wenige Milliliter, um sie für unsere Studie zu untersuchen.

Das Blut unserer Patienten untersuchen wir auf die Menge von Hitzeschockproteinen. Außerdem führen wir eine genetische Analyse durch, mit der wir feststellen können, ob der Patient grundsätzlich eher mehr oder eher weniger Hitzeschockproteine produziert. Für diese genetische Untersuchung ist zusätzlich zur Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie eine weitere Einverständniserklärung notwendig. Daneben bestimmen wir noch verschiedene Routineparameter des Blutes, die uns helfen, die Ergebnisse unserer Untersuchungen in den gesamten Krankheitsverlauf einzuordnen.

Der Urin der Kinder wird darauf untersucht, ob überhaupt und wenn ja, wie viel Hitzeschockprotein in ihm vorliegt. Auch im Urin bestimmen wir Routineparameter zur Einordnung der Ergebnisse.

Risiken der Untersuchung

Unseren Patienten entstehen durch die Teilnahme an der HSP-Studie keine zusätzlichen Risiken. Die Entnahme des Blutes findet ausschließlich während der routinemäßig durchgeführten Blutentnahme auf der Intensivstation statt. Durch die Studie wird keine zusätzliche Blutentnahme ausgelöst. Der Urin wird auf der Intensivstation routinemäßig gesammelt, auch hierdurch entsteht kein zusätzliches Risiko. Außer Blut und Urin sind für unsere Studie keine Probenentnahmen notwendig. Es finden für die HSP-Studie auch keine weiteren Untersuchungen statt, die für unsere Patienten ein Risiko mit sich bringen würden.

Datenschutz

Bitte lesen Sie sich diesen Abschnitt genau durch und fragen Sie bei uns nach, falls Sie etwas nicht verstanden haben. Die Bestätigung dieses Abschnittes geben Sie in der Einverständniserklärung unter dem Punkt „Datenschutz“.

Alle im Rahmen der HSP-Studie erhobenen Daten unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Patientendaten aus der Krankenakte und die zugehörigen Untersuchungsergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert. Die Auswertung dieser Daten erfolgt pseudonymisiert. Zur Pseudonymisierung wird ein Verfahren verwendet, das nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis

Ballwieser eine Zuordnung der erfassten Daten zu einzelnen Patienten ermöglicht. Diese Zuordnung erfolgt nur, wenn die Klärung einer während der Studie auftretenden wissenschaftlichen Fragestellung dies erforderlich macht. Auch in diesen Fällen werden die Daten ausschließlich pseudonymisiert und ohne Bezug zu einer bestimmten Person an Dritte, die an der Auswertung der Studie beteiligt sind, weitergegeben. Auch in etwaigen Veröffentlichungen erscheinen Daten dieser klinischen Studie ausschließlich pseudonymisiert.

Speicherung der Daten Die in der Studie erhobenen Daten zur Person des Probanden und in der Studie erhobene Befunde werden in einem Computersystem (Original) und auf einem Datenträger (erstes Backup), sowie auf einem zusätzlichen Datenträger (zweites Backup) für den Fall eines Datenverlustes kennwortgeschützt gespeichert. Hierzu wird eine kennwortgeschützte Studiendatenbank (Studien-DB) angelegt. Sie ist nur für die Studienleiter Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und den medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglich. Zusätzlich erfolgt ein ständig aktualisierter Ausdruck, der für den Fall eines kompletten Datenverlustes einem nur den Studienleitern Dr. Glöckner-Pagel und Dr. Reiter und dem medizinischen Doktoranden Dennis Ballwieser zugänglichen Ort verschlossen aufbewahrt wird.

Pseudonymisierung Die Pseudonymisierung erfolgt mittels eines numerischen Verschlüsselungscode, in dem weder die exakten Initialen, noch das Geburtsdatum oder sonstige Personenbezogenen Merkmale aufscheinen. Die Probanden werden beginnend bei 1 durchnummeriert. Der Personenbezug der Daten wird sofort nach der Aufnahme des Probanden in die Studie aufgehoben. Hierzu wird bei der Aufnahme in die Studie das erste Blatt des zum Probanden gehörenden Protokolls vom Rest des Protokolls getrennt. Nur diese Seite enthält die Personendaten des Probanden und die Zuordnung, welches Pseudonym (Identifizierung, ID) der Proband in der Studie trägt. Die Daten dieses Blattes werden in eine kennwortgeschützte Pseudonymisierungsdatenbank (Pseudonym-DB) übernommen, das Blatt anschließend in einem wie oben beschrieben gesicherten Ordner abgeheftet. Von da an ist der Personenbezug der Daten nur durch Zugang zur Pseudonym-DB oder zum gesicherten Ordner möglich, welcher den Studienleitern und dem medizinischen Doktoranden vorbehalten ist.

Einwilligung

Die Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie erfolgt freiwillig und es besteht jederzeit die Möglichkeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Behandlung, die Teilnahme an der Studie vorzeitig zu beenden.

Stand dieser Informationen

Diese Information wurde im August 2005 erstellt und im September 2005 nach den Vorgaben der Ethikkommission der LMU München überarbeitet. Sollten sich wichtige Änderungen ergeben, wird Sie einer der beiden Prüfvärzte und Studienleiter umgehend informieren.

Persönliches Gespräch

Zusätzlich zu dieser Information findet vor der Aufnahme in die Studie ein persönliches Gespräch mit Ihnen statt. Bitte stellen Sie in diesem Aufklärungsgespräch alle Fragen, die Sie zur HSP-Studie haben.

So erreichen Sie uns

Dr. med. Judith Glöckner-Pagel Telefon: 0 89 / 51 60 - 28 11 (Pforte) oder 78 13 E-Mail: judith.gloeckner@med.uni-muenchen.de

Dr. med. Karl Reiter Telefon: 0 89 / 51 60 - 28 11 (Pforte) oder 28 41 E-Mail: karl.reiter@med.uni-muenchen.de

Dr. von Haunersches Kinderspital Ludwig-Maximilians-Universität München Lindwurmstraße 4 80337 München

6.4.2 Englische Version

Dear parents, with this document you receive all the information you need about the study we would like to include your child in. Please read the given information carefully and put questions either to Ms. Judith Glöckner-Pagel, MD or to Mr. Karl Reiter, MD. Both are the study chairs of the HSP-Study. You will find their contact information at the end of this letter.

The aim of the HSP-Study

The aim of the HSP-Study is to investigate whether particular proteins in the human body, so-called heat shock proteins (HSP), are affecting the course of acute renal failure in children. We are assuming that patients who are able to produce great amounts of heat shock proteins will not develop acute renal failure. If they are doing so nonetheless, they should cope better with acute renal failure than those patients who produce less heat shock proteins.

Background of our research

Some very sick children develop acute renal failure. Although the disease is treated intensively it may proceed severe, even fatal. Medical scientists are searching for protecting factors that prevent or weaken acute renal failure. The heat shock proteins investigated by our group are promising candidates for being such protecting factors. Up to now there are virtually no investigations on the appearance of heat shock proteins in children with acute renal failure.

The body produces heat shock proteins as a reaction on cell stress. The heat shock proteins help the cells coping with stress. We already know that children with a septic shock – which means cell stress – are showing more heat shock proteins in their blood than normally. We know of some investigations in children with a renal transplant. They showed

heat shock proteins in the urine of these patients. Possibly this is a sign that renal cells are producing heat shock proteins. From research in rats we know that animals with higher heat shock protein concentrations in the blood are coping better with renal cell stress than those animals with normal blood levels of heat shock proteins.

What we are investigating

All children included in the HSP-Study are being treated on an intensive care unit (ICU). Starting with the admission to ICU blood will be taken in regular intervals from the children for routine testing of basic life functions. From children included in the HSP-Study we will take few additional millilitres at these routine blood takings. We need this blood to test it for heat shock proteins.

From patients who are developing or might develop acute renal failure urine is collected to judge it every 24 hours. From this 24-hour-urine we will take some other few millilitres for the HSP-Study after the attending physician did his testing.

We are testing the blood of our patients for the amount of heat shock proteins contained. Additionally we do genetic analyses of the blood cells. We want to know if our patients are so-called low-producers or high-producers of heat shock proteins, which is determined genetically. For these genetic tests we need written informed consent additional to the general written informed consent for the participation in the HSP-Study. We are collecting other routine parameters as well that help us to classify the results of our tests regarding the course of disease.

The urine of the children will be tested for heat shock proteins similar to the blood. We are collecting routine parameters from the urine as well.

Risks of investigation

There are no additional risks for our patients through their participation in the HSP-Study. The blood taking is invariably part of the routine blood taking on ICU. There will be no additional blood taking triggered by the HSP-Study. The urine collection is part of the diagnostic routine of the ICU as well. There will be no additional risk for the children through the urine collection. We do not need any additional samples from patients participating in the HSP-Study. There will be no additional examinations for the HSP-Study that could hold additional risks for our patients.

Data protection

Please read this section carefully and ask us if you do not understand something in it. You will confirm this section in the written informed consent section in the “data protection” paragraph.

All data collected for the HSP-Study are subject to the physician confidentiality. Data from the patient record and related test results are collected in a database. Interpretation of these data will be carried out pseudonymous. To make the data pseudonymous a procedure is used by that only study chair Ms. Glöckner-Pagel, MD, study chair Mr. Karl Reiter,

MD and doctoral candidate Dennis Ballwieser are able to assign the collected data to certain patients. This assignment will only be applied if a scientific question during the study is requiring it. In this case as well the data will be given pseudonymously only and without connection to a certain patient to third persons who are involved in the data interpretation. In possible publications of the HSP-Study data will be presented without exception pseudonymously only as well.

Data storage Data collected for the HSP-Study containing patient information is stored in a computer system (original), on a data storage medium (first backup) and on an additional data storage medium (second backup) in case of a data loss. All data is protected by password. A password-protected database is created for this purpose (study-DB). Additionally we will produce up-to-date printouts of the database constantly. This printout will be stored at a locked place, only accessible for study chairs Ms. Glöckner-Pagel, MD and Mr. Karl Reiter, MD and doctoral candidate Dennis Ballwieser.

Data pseudonymisation Pseudonymisation is made with a numeric code that neither contains the true initials nor the birth date or other personal data of the study participant. The participants are being numbered, starting with 1. At inclusion of a patient into the HSP-Study the first page of the protocol will be separated from the rest of the protocol. Only this first page contains personal data of the participant and the mapping with the pseudonym of the participant for the study (identification, ID). The data of this page are stored in a password-locked pseudonym database (pseudonym-DB). The original page will be filed in a disposer that is stored in a locked place. From this moment on the mapping of personal data with participant IDs is only possible via the pseudonym-DB or the locked disposer. Both files are available for the study chairs and the doctoral candidate only.

Written informed consent

Consent to the participation in the HSP-Study is voluntarily. At any point you are free to withdraw from the participation without giving a reason and without any negative consequences for the treatment of the patient.

Last update of this information

This information was written in August 2005 and last revived in September 2005 according to the ethical committee of Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU München). The study chair would inform you of any major changes in this information immediately.

Personal dialogue

In addition to this written information one of the study physicians will talk with you about the HSP-Study and a possible inclusion of your child. Please ask any questions you have at this conversation.

Contact information

Dr. Judith Glöckner-Pagel, MD Phone: +49 – 89 / 51 60 – 28 11 or 78 13 E-Mail: judith.gloeckner@med.uni-muenchen.de

Dr. med. Karl Reiter, MD Phone: +49 – 89 / 5160 – 2811 or 2841 E-Mail: karl.reiter@med.uni-muenchen.de

Dr. von Haunersches Kinderspital Ludwig-Maximilians-Universität München Lindwurmstraße 4 80337 München Germany

Literaturverzeichnis

- [1] ABUELO, J G.: Normotensive ischemic acute renal failure. In: *N Engl J Med* 357 (2007), Aug, Nr. 8, S. 797–805. – ISSN 1533-4406 (Electronic); 0028-4793 (Linking)
- [2] AKCAN-ARIKAN, A ; ZAPPITELLI, M ; LOFTIS, L L. ; WASHBURN, K K. ; JEFFERSON, L S. ; GOLDSTEIN, S L.: Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. In: *Kidney Int* 71 (2007), May, Nr. 10, S. 1028–1035. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [3] ANDREOLI, Sharon P.: Acute renal failure. In: *Curr Opin Pediatr* 14 (2002), Apr, Nr. 2, S. 183–188. – ISSN 1040-8703 (Print); 1040-8703 (Linking)
- [4] ANDREOLI, Sharon P.: Acute kidney injury in children. In: *Pediatr Nephrol* 24 (2009), Feb, Nr. 2, S. 253–263. – ISSN 0931-041X (Print); 0931-041X (Linking)
- [5] AUFRICHT, Christoph: HSP: helper, suppressor, protector. In: *Kidney Int* 65 (2004), Feb, Nr. 2, S. 739–740. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [6] AUFRICHT, Christoph: Heat-shock protein 70: molecular supertool? In: *Pediatr Nephrol* 20 (2005), Jun, Nr. 6, S. 707–713. – ISSN 0931-041X (Print); 0931-041X (Linking)
- [7] AUFRICHT, Christoph ; BIDMON, Bettina ; RUFFINGSHOFER, Dagmar ; REGELE, Heinz ; HERKNER, Kurt ; SIEGEL, Norman J. ; KASHGARIAN, Michael ; VAN WHY, Scott K.: Ischemic conditioning prevents Na,K-ATPase dissociation from the cytoskeletal cellular fraction after repeat renal ischemia in rats. In: *Pediatr Res* 51 (2002), Jun, Nr. 6, S. 722–727. – ISSN 0031-3998 (Print); 0031-3998 (Linking)
- [8] BALLWIESER, Dennis: *HSP-Studie.de*. 2005. – URL <http://www.hsp-studie.de/>. – Zugriffsdatum: 01.01.2010
- [9] BANAS, Miriam C. ; BANAS, Bernhard ; HUDKINS, Kelly L. ; WIETECH, Tomasz A. ; IYODA, Masayuki ; BOCK, Elisabeth ; HAUSER, Peter ; PIPPIN, Jeffrey W. ; SHANKLAND, Stuart J. ; SMITH, Kelly D. ; STOELCKER, Benjamin ; LIU, Gang ; GRONE, Hermann-Josef ; KRAMER, Bernhard K. ; ALPERS, Charles E.: TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. In: *J Am Soc Nephrol* 19 (2008), Apr, Nr. 4, S. 704–713. – ISSN 1533-3450 (Electronic); 1046-6673 (Linking)

- [10] BARLETTA, Gina-Marie ; BUNCHMAN, Timothy E.: Acute renal failure in children and infants. In: *Curr Opin Crit Care* 10 (2004), Dec, Nr. 6, S. 499–504. – ISSN 1070-5295 (Print); 1070-5295 (Linking)
- [11] BARRERA-CHIMAL, Jonatan ; PEREZ-VILLALVA, Rosalba ; CORTES-GONZALEZ, Cesar ; OJEDA-CERVANTES, Marcos ; GAMBA, Gerardo ; MORALES-BUENROSTRO, Luis E. ; BOBADILLA, Norma A.: Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. In: *EMBO Mol Med* 3 (2011), Jan, Nr. 1, S. 5–20. – ISSN 1757-4684 (Electronic); 1757-4676 (Linking)
- [12] BELL, Max: Acute kidney injury: new concepts, renal recovery. In: *Nephron Clin Pract* 109 (2008), Nr. 4, S. c224–8. – ISSN 1660-2110 (Electronic); 1660-2110 (Linking)
- [13] BELLOMO, Rinaldo ; KELLUM, John A. ; RONCO, Claudio: Defining and classifying acute renal failure: from advocacy to consensus and validation of the RIFLE criteria. In: *Intensive Care Med* 33 (2007), Mar, Nr. 3, S. 409–413. – ISSN 0342-4642 (Print); 0342-4642 (Linking)
- [14] BIDMON, B ; ENDEMANN, M ; MULLER, T ; ARBEITER, K ; HERKNER, K ; AUFRICHT, C: Heat shock protein-70 repairs proximal tubule structure after renal ischemia. In: *Kidney Int* 58 (2000), Dec, Nr. 6, S. 2400–2407. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [15] BIDMON, Bettina ; ENDEMANN, Michaela ; MULLER, Thomas ; ARBEITER, Klaus ; HERKNER, Kurt ; AUFRICHT, Christoph: HSP-25 and HSP-90 stabilize Na,K-ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. In: *Kidney Int* 62 (2002), Nov, Nr. 5, S. 1620–1627. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [16] BOLLA, M K. ; MILLER, G J. ; YELLON, D M. ; EVANS, A ; LUC, G ; CAMBOU, J P. ; ARVEILER, D ; CAMBIEN, F ; LATCHMAN, D S. ; HUMPHRIES, S E. ; DAY, I N.: Analysis of the association of a heat shock protein70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits. In: *Dis Markers* 13 (1998), Feb, Nr. 4, S. 227–35
- [17] BORKAN, Steven C. ; GULLANS, Steven R.: Molecular chaperones in the kidney. In: *Annu Rev Physiol* 64 (2002), S. 503–527. – ISSN 0066-4278 (Print); 0066-4278 (Linking)
- [18] BUDDE, Klemens: *Harrisons Innere Medizin*. Kap. Akutes Nierenversagen, S. 1761–1770, McGraw-Hill, 2005
- [19] CAPLEN, N J. ; PATEL, A ; MILLWARD, A ; CAMPBELL, R D. ; RATANACHAIYAVONG, S ; WONG, F S. ; DEMAINE, A G.: Complement C4 and heat shock protein 70 (HSP70) genotypes and type I diabetes mellitus. In: *Immunogenetics* 32 (1990), Nr. 6, S. 427–30

- [20] ENGVALL, E ; PERLMANN, P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (1971), Sep, Nr. 9, S. 871–874. – ISSN 0019-2791 (Print); 0019-2791 (Linking)
- [21] FAVATIER, F ; BORNMAN, L ; HIGHTOWER, L E. ; GÜNTHER, E ; POLLA, B S.: Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? In: *Cell Stress Chaperones* 2 (1997), Sep, Nr. 3, S. 141–55
- [22] FAVIA, Isabella ; GARISTO, Cristiana ; ROSSI, Eugenio ; PICARDO, Sergio ; RICCI, Zaccaria: Fluid management in pediatric intensive care. In: *Contrib Nephrol* 164 (2010), S. 217–226. – ISSN 1662-2782 (Electronic); 0302-5144 (Linking)
- [23] FEKETE, Andrea ; TRESZL, Andras ; TOTH-HEYN, Peter ; VANNAY, Adam ; TORDAI, Attila ; TULASSAY, Tivadar ; VASARHELYI, Barna: Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. In: *Pediatr Res* 54 (2003), Oct, Nr. 4, S. 452–455. – ISSN 0031-3998 (Print); 0031-3998 (Linking)
- [24] GALLE, J ; HEERMEIER, K ; WANNER, C: Atherogenic lipoproteins, oxidative stress, and cell death. In: *Kidney Int Suppl* 71 (1999), Jul, S. S62–5. – ISSN 0098-6577 (Print); 0098-6577 (Linking)
- [25] GOATE, A M. ; COOPER, D N. ; HALL, C ; LEUNG, T K. ; SOLOMON, E ; LIM, L: Localization of a human heat-shock HSP 70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic-cell hybrid and restriction fragment length polymorphism analysis. In: *Hum Genet* 75 (1987), Feb, Nr. 2, S. 123–8
- [26] GOLDSTEIN, Brahm ; GIROIR, Brett ; RANDOLPH, Adrienne: International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. In: *Pediatr Crit Care Med* 6 (2005), Jan, Nr. 1, S. 2–8. – ISSN 1529-7535 (Print); 1529-7535 (Linking)
- [27] HUNFELD, Thomas A und Brade V.: *Labor und Diagnose*. Kap. Methoden und Prinzipien serologischer und molekularbiologischer Diagnostik bakterieller Infektionen, S. 1585–1591, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 2008
- [28] JO, Sang-Kyung ; KO, Gang J. ; BOO, Chang S. ; CHO, Won Y. ; KIM, Hyoung K.: Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury. In: *J Am Soc Nephrol* 17 (2006), Nov, Nr. 11, S. 3082–3092. – ISSN 1046-6673 (Print); 1046-6673 (Linking)
- [29] JOANNIDIS, M ; CANTLEY, L G. ; SPOKES, K ; MEDINA, R ; PULLMAN, J ; ROSEN, S ; EPSTEIN, F H.: Induction of heat-shock proteins does not prevent renal tubular

- injury following ischemia. In: *Kidney Int* 47 (1995), Jun, Nr. 6, S. 1752–1759. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [30] KAROLY, Eva ; FEKETE, Andrea ; BANKI, Nora F. ; SZEBENI, Beata ; VANNAY, Adam ; SZABO, Attila J. ; TULASSAY, Tivadar ; REUSZ, Georg S.: Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. In: *Pediatr Res* 61 (2007), Mar, Nr. 3, S. 371–4
- [31] KELLY, K J. ; BAIRD, N R. ; GREENE, A L.: Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion. In: *Kidney Int* 59 (2001), May, Nr. 5, S. 1798–1802. – ISSN 0085-2538 (Print); 0085-2538 (Linking)
- [32] KIRKWOOD, Betty R. ; STERNE, Jonathan A. C.: *Essential Medical Statistics*. 2. Blackwell Science Ltd., 2003
- [33] LAEMMLI, U K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–685. – ISSN 0028-0836 (Print); 0028-0836 (Linking)
- [34] LAMEIRE, Norbert ; VAN BIESEN, Wim ; VANHOLDER, Raymond: Acute renal failure. In: *Lancet* 365 (2005), Jan, Nr. 9457, S. 417–430. – ISSN 1474-547X (Electronic); 1474-547X (Linking)
- [35] LASSEN, Saraswati ; LECH, Maciej ; ROMMELE, Christoph ; MITTRUECKER, Hans-Willi ; MAK, Tak W. ; ANDERS, Hans-Joachim: Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure. In: *J Immunol* 185 (2010), Aug, Nr. 3, S. 1976–1983. – ISSN 1550-6606 (Electronic); 0022-1767 (Linking)
- [36] MACHEREY-NAGEL: *PCR clean-up Gel extraction*. 04 2007
- [37] MUELLER, Thomas ; BIDMON, Bettina ; PICHLER, Patrick ; ARBEITER, Klaus ; RUFINGSHOFER, Dagmar ; VANWHY, Scott K. ; AUFRICHT, Christoph: Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia. In: *Pediatr Nephrol* 18 (2003), Feb, Nr. 2, S. 97–99. – ISSN 0931-041X (Print); 0931-041X (Linking)
- [38] NIH: *ClinicalTrials.gov*. 1997. – URL <http://www.clinicaltrials.gov/>. – Zugriffsdatum: 01.01.2010
- [39] OZER, E A. ; YILMAZ, O ; AKHISAROGLU, M ; TUNA, B ; BAKILER, A R. ; OZER, E: Heat shock protein 70 expression in neonatal rats after hypoxic stress. In: *J Matern Fetal Neonatal Med* 12 (2002), Aug, Nr. 2, S. 112–7

- [40] PARIKH, Chirag R. ; JANI, Alkesh ; MELNIKOV, Vyacheslav Y. ; FAUBEL, Sarah ; EDELSTEIN, Charles L.: Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. In: *Am J Kidney Dis* 43 (2004), Mar, Nr. 3, S. 405–414. – ISSN 1523-6838 (Electronic); 0272-6386 (Linking)
- [41] POOLE, Brian ; WANG, Wei ; CHEN, Yung-Chang ; ZOLTY, Einath ; FALK, Sandor ; MITRA, Amitabha ; SCHRIER, Robert: Role of heme oxygenase-1 in endotoxemic acute renal failure. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 289 (2005), Dec, Nr. 6, S. F1382–5. – ISSN 0363-6127 (Print); 0363-6127 (Linking)
- [42] QUIAGEN: *FlexiGene DNA Handbook*. 02 2003
- [43] RATANACHAIYAVONG, S ; DEMAINE, A G. ; CAMPBELL, R D. ; MCGREGOR, A M.: Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease. In: *Clin Exp Immunol* 84 (1991), Apr, Nr. 1, S. 48–52
- [44] REDAELLI, Claudio A. ; TIEN, Ying-Hua ; KUBULUS, Darius ; MAZZUCHELLI, Luca ; SCHILLING, Martin K. ; WAGNER, Andreas C C.: Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. In: *Nephron* 90 (2002), Apr, Nr. 4, S. 489–497. – ISSN 0028-2766 (Print); 0028-2766 (Linking)
- [45] RITOSSA, Ferruccio: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. In: *Experientia* 18 (1962), 12, Nr. 12, S. 571–573
- [46] SAIKI, R K. ; SCHARF, S ; FALOONA, F ; MULLIS, K B. ; HORN, G T. ; ERLICH, H A. ; ARNHEIM, N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* 230 (1985), Dec, Nr. 4732, S. 1350–1354. – ISSN 0036-8075 (Print); 0036-8075 (Linking)
- [47] SCHRIER, Robert W. ; WANG, Wei: Acute renal failure and sepsis. In: *N Engl J Med* 351 (2004), Jul, Nr. 2, S. 159–169. – ISSN 1533-4406 (Electronic); 1533-4406 (Linking)
- [48] SCHRIER, Robert W. ; WANG, Wei ; POOLE, Brian ; MITRA, Amit: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. In: *J Clin Invest* 114 (2004), Jul, Nr. 1, S. 5–14. – ISSN 0021-9738 (Print); 0021-9738 (Linking)
- [49] STRESSGEN: *Assay Designs Hsp70 ELISA Kit*. 08 2007
- [50] THOMAS, Lothar: *Labor und Diagnose*. Kap. Immunchemische Techniken, S. 1915–1964, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 2008
- [51] TOWBIN, H ; STAHELIN, T ; GORDON, J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), Sep, Nr. 9, S. 4350–4354. – ISSN 0027-8424 (Print); 0027-8424 (Linking)

- [52] VASARHELYI, Barna ; TOTH-HEYN, Peter ; TRESZL, Andras ; TULASSAY, Tivadar: Genetic polymorphisms and risk for acute renal failure in preterm neonates. In: *Pediatr Nephrol* 20 (2005), Feb, Nr. 2, S. 132–135. – ISSN 0931-041X (Print); 0931-041X (Linking)
- [53] VICENCIO, Alfin ; BIDMON, Bettina ; RYU, Julie ; REIDY, Kim ; THULIN, Gunilla ; MANN, Andrea ; GAUDIO, Karen M. ; KASHGARIAN, Michael ; SIEGEL, Norman J.: Developmental expression of HSP-72 and ischemic tolerance of the immature kidney. In: *Pediatr Nephrol* 18 (2003), Feb, Nr. 2, S. 85–91. – ISSN 0931-041X (Print); 0931-041X (Linking)
- [54] WANG, Z ; GALL, JM ; BONEGIO, RG ; HAVASI, A ; HUNT, CR ; SHERMAN, MY ; SCHWARTZ, JH ; BORKAN, SC: Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. In: *Kidney Int* (2011), Jan. – ISSN 1523-1755 (Electronic); 0085-2538 (Linking)
- [55] WHEELER, Derek S. ; FISHER, Lyle E J. ; CATRAVAS, John D. ; JACOBS, Brian R. ; CARCILLO, Joseph A. ; WONG, Hector R.: Extracellular hsp70 levels in children with septic shock. In: *Pediatr Crit Care Med* 6 (2005), May, Nr. 3, S. 308–311. – ISSN 1529-7535 (Print); 1529-7535 (Linking)
- [56] WU, Huiling ; CHEN, Gang ; WYBURN, Kate R. ; YIN, Jianlin ; BERTOLINO, Patrick ; ERIS, Josette M. ; ALEXANDER, Stephen I. ; SHARLAND, Alexandra F. ; CHADBAN, Steven J.: TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. In: *J Clin Invest* 117 (2007), Oct, Nr. 10, S. 2847–2859. – ISSN 0021-9738 (Print); 0021-9738 (Linking)
- [57] ZAGER, R A. ; JOHNSON, Ali C M. ; HANSON, Sherry Y. ; LUND, Steve: Ischemic proximal tubular injury primes mice to endotoxin-induced TNF-alpha generation and systemic release. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 289 (2005), Aug, Nr. 2, S. F289–97. – ISSN 0363-6127 (Print); 0363-6127 (Linking)
- [58] ZAGER, Richard A. ; JOHNSON, Ali C M. ; LUND, Steven ; RANDOLPH-HABECKER, Julie: Toll-like receptor (TLR4) shedding and depletion: acute proximal tubular cell responses to hypoxic and toxic injury. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 292 (2007), Jan, Nr. 1, S. F304–12. – ISSN 0363-6127 (Print); 0363-6127 (Linking)
- [59] ZEE, Robert Y L. ; BATES, David ; RIDKER, Paul M.: A prospective evaluation of the heat shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of stroke. In: *Thromb Haemost* 87 (2002), Apr, Nr. 4, S. 622–5

Danksagung

Dr. Judith Glöckner-Pagel danke ich herzlich für die Chance, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten, für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Begeisterung für das Projekt, spannende Diskussionen und die hervorragende Betreuung.

Dr. Karl Reiter danke ich für seine Idee zur HSP-Studie, seine Begeisterung für das gemeinsame Projekt, seine kritischen Hinweise und anregende Diskussionen.

Prof. Dr. Adelbert A. Roscher danke ich für die Möglichkeit, die HSP-Studie im Forschungskubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchführen zu können, sein Interesse an meiner Arbeit und ihrer Problemstellung, seine Anregungen zur Arbeit und für die kritische Begleitung der HSP-Studie.

Dr. Philipp Pagel danke ich für seine uneigennütige Unterstützung der HSP-Studie seit ihrem Beginn, die unersetzliche Hilfe bei der statistischen Planung und der Auswertung der Ergebnisse und seine technische Unterstützung bei der Analyse der Studienergebnisse und dem Schreiben dieser Dissertation.

Benjamin Ackermann danke ich für seine unermüdliche Unterstützung, ausdauernd geführte und befruchtende Diskussionen und seine stete offene Kritik, ohne die diese Dissertation nicht vorliegen würde.

Dr. Jakob Armann danke ich für regelmäßige spannende Diskussionen und seine überzeugende formale und inhaltliche Kritik.

Für die inhaltliche, technische und logistische Unterstützung bei meiner Arbeit im Forschungskubus danke ich *Dr. Christine Schulze* und *Jan Tausendfreund*, ohne deren tatkräftige Hilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre. *Stefan Hecht* danke ich für die ansprechende Gestaltung des Designs der HSP-Studie.

Für ihre unermüdliche und uneingeschränkte Unterstützung danke ich *Wolfgang, Sigrid* und *Alice Ballwieser*.

Besonderen Dank schulde ich meiner Frau *Anja Ballwieser*, ohne deren Kraft und liebevollen Zuspruch diese Dissertation nicht entstanden wäre und die viel zu häufig auf mich verzichten muss.

