

Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Danilo Fliser

---

**FGF-23**  
**– ein Parameter zur Risikostratifizierung kardiovaskulärer  
Mortalität bei chronisch nierenkranken Patienten?**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2011

vorgelegt von:

Daniel Thorsten Roth

geb. am 11.12.1979 in St. Wendel

Diese Dissertationsarbeit ist in der Forschungs-AG 1 „Kardiovaskuläre Komplikationen bei chronischer Niereninsuffizienz“ unter Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Gunnar Heine an der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten (Direktor: Prof. Dr. med. Danilo Fliser), Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar entstanden.

## Inhaltsverzeichnis

1	Übersicht.....	8
1.1	Plasma FGF-23 levels – a predictor of cardiovascular mortality in CKD patients? .....	9
2	Einleitung .....	11
2.1	Fragestellung .....	11
2.2	Fibroblast Growth Factor FGF .....	12
2.2.1	Entdeckung von FGF-23 .....	12
2.2.2	Biochemischer Aufbau der FGF-Proteine .....	12
2.2.3	Physiologische Funktionen von FGF beim Menschen .....	13
2.2.3.1	Funktionen der FGF-19-Subfamilie .....	13
2.2.3.2	Subfamilienspezifische Eigenschaften .....	13
2.2.4	FGF-23.....	14
2.2.4.1	Biochemischer Aufbau von FGF-23 .....	14
2.2.4.2	Klotho-Co-Faktor und FGF-Rezeptoren .....	14
2.2.4.2.1	Biochemischer Aufbau des Klotho-Co-Faktors .....	14
2.2.4.2.2	FGF-Rezeptoren – Struktur und Expression .....	14
2.2.4.2.3	Zusammenspiel von FGF-23, FGF-R und Klotho.....	15
2.2.4.3	Physiologische Funktionen von FGF-23 bei Nierengesunden .....	15
2.2.4.4	Pathophysiologische Funktionen von FGF-23 bei chronisch nierenkranken Patienten .....	15
2.2.4.4.1	Konventionelle Vorstellung des sekundären Hyperparathyreo- idismus.....	15
2.2.4.4.2	Modifizierte Vorstellung des sekundären Hyperparathyreo- idismus.....	17
2.2.4.4.3	FGF-23 und Phosphathaushalt .....	18
2.2.4.4.4	Interaktion von FGF-23 und Parathormon.....	19
2.2.4.4.5	Interaktion von FGF-23 und Calcitriol.....	19
3	Patientenkollektiv und Methoden .....	21
3.1	Studiendesign .....	21
3.2	Ausschlusskriterien .....	21
3.3	Datenakquisition.....	21
3.3.1	Studieneinschluss .....	21

3.3.2	Follow-Up.....	22
3.3.3	Datenaufbereitung.....	23
3.3.4	Endpunktdefinitionen.....	23
3.4	FGF-23-Messungen.....	24
3.4.1	Material.....	24
3.4.2	Prinzipien verfügbarer Nachweisverfahren für FGF-23.....	25
3.4.3	Nachweismethode des verwendeten Test-Kits.....	25
3.4.4	Technisches Vorgehen.....	28
3.4.5	Photometrische Messungen.....	29
3.4.6	Messtechnische Limitationen des verwendeten Test-Kits.....	30
3.5	Statistische Auswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Ergebnisse der FGF-23-Messungen.....	33
4.2	Zusammensetzung und Charakteristika der Studienkohorte.....	33
4.3	Korrelationen der Nierenfunktion mit Parametern des Calcium- Phosphat-Metabolismus.....	35
4.3.1	Etablierte Parameter des Calcium-Phosphat-Metabolismus.....	35
4.3.2	FGF-23.....	36
4.4	Chronische Nierenerkrankung und kumulatives Überleben.....	37
4.5	Studienendpunkte und FGF-23-Spiegel.....	38
4.5.1	FGF-23 und renale Endpunkte.....	38
4.5.2	FGF-23 und kardiovaskuläre Studienendpunkte.....	41
4.5.3	FGF-23 und Gesamtmortalität.....	42
4.5.4	Exkurs.....	44
5	Diskussion.....	47
5.1	Kardiorenale Komorbidität.....	47
5.2	Konsistenz zu vorausgehenden Studien.....	47
5.3	Konventionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	48
5.4	Erhöhte FGF-23-Spiegel bei chronisch nierenkranken Patienten – Ausdruck verminderter renaler Elimination oder erhöhter Sekretion?.....	48
5.5	FGF-23 als Prognoseparameter.....	50
5.6	FGF-23 und kardiovaskuläre Risikoprognoseinstrumente.....	52

---

5.7	Therapeutische Relevanz einer gezielten Beeinflussung der FGF-23-Spiegel.....	53
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick .....	54
6	Literaturverzeichnis .....	56
7	Darstellungsverzeichnis .....	65
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	65
7.2	Tabellenverzeichnis .....	66
8	Publikationen .....	67
9	Anhang .....	68
9.1	Datenerhebung Hausarztbefragung .....	68
9.2	Datenerhebungsbogen Patienten .....	71
9.3	Danksagung.....	74
9.4	Lebenslauf .....	75

**Übersicht über die verwendeten Abkürzungen und Symbole**

Aa	Arterien
ACE	angiotensin converting enzyme
BMI	body mass index
BNP	brain natriuretic peptide
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CKD	chronic kidney disease
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FGF	fibroblast growth factor
FGF-R	fibroblast growth factor receptor
HDL	high density lipoprotein
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IQR	Interquartils-Range, Interquartilsabstand
K/DOQI	Kidney disease outcomes quality initiative
kDa	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
MDRD	modification of diet in renal disease
Na/Pi	Natrium-abhängiger Phosphat-Transporter
N, n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
p	Wahrscheinlichkeit
rpm	rounds per minute
RNA	ribonucleic acid
R, r	Korrelationskoeffizient
RR	Riva Rocci
RU	relative unit
SD	standard deviation, Standardabweichung
TMB	Tetramethylbenzidin
vs	versus

**Übersicht über die verwendeten Hilfsmittel**

Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Human FGF-23 (C-Term) ELISA Kit, Immunotopics Inc., San Clemente, USA

Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA

SPSS Statistics 13.0.1 und 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL 60606, USA

TECAN Hydroflex Washer, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

TECAN sunrise ELISA Reader, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

# 1 Übersicht

## Hintergrund und Arbeitshypothese

Patienten mit chronischer Nierenerkrankung leiden unter einer systemischen Vasosklerose und einem dadurch konsekutiv erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität. Eine mögliche Erklärung hierfür kann ein gestörter Calcium-Phosphat-Stoffwechsel sein, der im Wesentlichen durch niedrignormales Serum-Calcium, Hyperphosphatämie, sekundären Hyperparathyreoidismus, niedrige Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel und hohe FGF-23-Spiegel gekennzeichnet ist.

FGF-23 ist ein erst kürzlich entdecktes Protein, dem eine Schlüsselrolle in der Regulation des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels zukommt. Es steigert zum einen die renale Phosphatausscheidung und senkt zum anderen gleichzeitig die Spiegel des zirkulierenden Calcitriols. In Vorarbeiten konnten erhöhte FGF-23-Spiegel mit einer erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit dialysepflichtiger Patienten assoziiert werden. Bei Patienten mit chronischer nicht-dialysepflichtiger Niereninsuffizienz waren hohe FGF-23-Spiegel Prädiktoren für die Progredienz der renalen Grunderkrankung. Der Einfluss auf kardiovaskuläre Endpunkte ist bei dieser Patientensubpopulation bislang nicht hinlänglich untersucht worden.

Wir formulieren die Hypothese, dass bei Patienten mit nicht-dialysepflichtiger chronischer Nierenerkrankung erhöhte FGF-23-Spiegel im Plasma unabhängig von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren mit einer erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert sind.

## Patientenkollektiv und Methoden

In einer prospektiven Längsschnittstudie wurden 152 Patienten mit chronischer nicht-dialysepflichtiger Nierenerkrankung (im Stadium K/DOQI 1-5) beobachtet. Mit konventionellen Labormethoden wurden bei Studienbeginn kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie etablierte Parameter der Nierenfunktion und des Calcium-Phosphat-Metabolismus bestimmt; mittels ELISA wurden die Spiegel von C-terminalen FGF-23 gemessen und die Patienten anhand ihrer FGF-23-Spiegel stratifiziert.

Es erfolgte ein Follow-Up der Patienten über 3 Jahre, wobei das Auftreten eines kombinierten Endpunktes bestehend aus kardiovaskulären Ereignissen oder Tod erfasst wurde.

## **Ergebnisse**

Zu Studienbeginn korrelieren die FGF-23-Spiegel signifikant mit den eGFR-Werten ( $R = 0,603$ ;  $p < 0,001$ ), dem Phosphat-Spiegel ( $R = 0,437$ ;  $p < 0,001$ ), und dem Parathormon-Spiegel ( $R = 0,591$ ;  $p < 0,001$ ). Patienten mit höheren FGF-23-Spiegeln ( $> 104$  RU/ml) zeigen signifikant ein schlechteres ereignisfreies Überleben als Patienten mit niedrigeren Spiegeln ( $\leq 104$  RU/ml).

## **Schlussfolgerung und Ausblick**

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass hohe FGF-23-Spiegel als unabhängige Prädiktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und kardiovaskulärer Mortalität bei chronisch nierenkranken nicht-dialysepflichtigen Patienten dienen können. Eine therapeutische Senkung von erhöhten FGF-23-Spiegeln, z. B. durch den Einsatz von oralen Phosphatbindern, könnte daher eine wertvolle neue Behandlungsoption zur Prognoseverbesserung bei chronischer Nierenerkrankung darstellen, welche in zukünftigen Interventionsstudien überprüft werden sollte.

### **1.1 Plasma FGF-23 levels – a predictor of cardiovascular mortality in CKD patients?**

#### **Background and Hypothesis**

Patients with chronic kidney disease (CKD) suffer from systemic vascular calcification, which contributes to their substantial cardiovascular comorbidity and their increased mortality. Such vascular calcification may partly be explained by a disturbed calcium-phosphate metabolism, which is mainly characterized by hypo- to normocalcemia, hyperphosphatemia, secondary hyperparathyroidism, hypovitaminosis D<sub>3</sub> and elevated plasma FGF-23 levels.

The recently discovered protein FGF-23 plays a key role in the regulation of calcium-phosphate metabolism by increasing renal phosphate excretion and by lowering plasma calcitriol levels. Prior studies associated increased FGF-23 levels with increased cardiovascular mortality in CKD patients undergoing dialysis treatment. In non-dialysis dependent CKD patients, high FGF-23 levels predicted CKD progression, while their impact on cardiovascular events has not been examined sufficiently. We hypothesized that increased plasma FGF-23 levels are independently associated

with an increased incidence of cardiovascular morbidity and mortality in CKD patients not undergoing dialysis treatment.

### **Materials and Methods**

We recruited 152 patients suffering from CKD stages K/DOQI 1-5 into a prospective longitudinal study. Established cardiovascular risk factors, as well as parameters of renal function and of calcium-phosphate metabolism were measured by routine laboratory methods. Plasma levels of C-terminal FGF-23 were measured via ELISA, and patients were stratified according to their FGF-23 levels. Patients were followed for a mean of 3 years for the combined endpoint of incident cardiovascular events or death.

### **Results**

Baseline the plasma FGF-23 levels significantly correlate with eGFR ( $R = 0.603$ ,  $p < 0.001$ ), with plasma phosphate ( $R = 0.437$ ,  $p < 0.001$ ) and with serum parathyroid hormone ( $R = 0.591$ ,  $p < 0.001$ ). Patients with higher FGF-23 levels ( $> 104$  rU/mL) had significantly worse event-free survival compared to patients with lower FGF-23 levels ( $\leq 104$  rU/mL).

### **Conclusion and Outlook**

We report for the first time that high FGF-23 levels independently predict future cardiovascular events and mortality in non-dialysis dependent CKD patients. A therapeutic reduction of elevated FGF-23 levels by using e. g. oral phosphate binders holds promise as a new therapeutic strategy to improve prognosis in CKD patients, the benefit of which will have to be studied in interventional trials.

## 2 Einleitung

### 2.1 Fragestellung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Dialysebehandlung haben ein massiv erhöhtes Risiko, kardiovaskuläre Komplikationen zu entwickeln im Vergleich zu nicht nierenkranken Patienten [1]. Zu den klassischen, in zahlreichen Studien etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie systemarterieller Hypertonie, Nikotinabusus, Hyperlipidämie, Adipositas, Diabetes mellitus und familiäre Disposition treten nicht-klassische Risikofaktoren hinzu, innerhalb derer Störungen im Calcium-Phosphat-Stoffwechsel eine zentrale Bedeutung aufweisen [1].

Der gestörte Calcium-Phosphat-Stoffwechsel chronisch nierenkranker Menschen ist durch ein niedriges bis normales Serum-Calcium, normales bis erhöhtes Serum-Phosphat, niedriges Calcitriol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin-D}_3$ ) sowie hohe Parathormon-Spiegel [2] gekennzeichnet. Hyperphosphatämie, niedriges Calcitriol und Hyperparathyreoidismus sind voneinander unabhängige Prädiktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und/oder kardiovaskulärer Sterblichkeit, was in großen epidemiologischen Studien bei Patienten mit terminaler chronischer Nierenerkrankung gezeigt werden konnte [3;4;5].

Die aktuell verfügbaren Therapieoptionen in der Behandlung chronisch nierenkranker Patienten, wie eine frühzeitige medikamentöse Intervention mit ACE-Hemmern und Statinen [6;7], die Korrektur einer renalen Anämie durch die Verabreichung von Erythropoetinderivaten [8] und die Optimierung einer notwendigen Dialysebehandlung [9] erzielen leider keine wesentliche Verbesserung der Prognose chronisch nierenkranker Patienten. Umso mehr benötigen wir neue therapeutische Ziele, um das deutlich erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei chronisch nierenkranken Patienten günstig beeinflussen zu können.

Ein potentieller Ansatzpunkt ergibt sich aus unserem in den letzten Jahren modifiziertem Verständnis des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels, nachdem das Protein FGF-23 als ein wichtiger phosphaturisch wirkender Regulator identifiziert werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, ob ein erhöhter FGF-23-Spiegel im Plasma neben den tradierten Risikofaktoren ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen oder Mortalität bei nicht-dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung unterschiedlicher Genese ist und ob somit

Studienergebnisse bei chronisch dialysepflichtigen Patienten [3;4] auf chronisch nierenkranke nicht-dialysepflichtige Patienten übertragbar sind.

## **2.2 Fibroblast Growth Factor FGF**

### **2.2.1 Entdeckung von FGF-23**

Die klinische Relevanz von FGF-23 beim Menschen wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen erblicher Phosphat-Stoffwechselerkrankungen erstmals evident. Fast zeitgleich mit der Entdeckung des FGF-23 bei Mäusen im Jahr 2000 von Yamashita et al. [10] konnte FGF-23-cDNA aus einem Osteomalazie - induzierenden Tumor kloniert werden [11].

Ähnliche klinische Erscheinungsbilder und Laborkonstellationen finden sich auch bei anderen Phosphat-Stoffwechselerkrankungen, wie z. B. der autosomal dominant vererbten hypophosphatämischen Rachitis, der X-chromosomal vererbten Hypophosphatämie oder bei anderen autosomal rezessiv vererbten hypophosphatämischen Osteomalazien.

Bei all diesen Krankheitsentitäten sind die FGF-23-Spiegel erhöht [12;13;14]. Im Gegensatz dazu lassen sich die Hyperphosphatämie und die extraossäre Calcifizierung von Gefäßen und Geweben bei Patienten mit tumorinduzierter Hyperphosphatämie und Calcinose auf funktionell inaktivierende Mutationen des FGF-23-Gens zurückführen [11].

### **2.2.2 Biochemischer Aufbau der FGF-Proteine**

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind eine Familie von Polypeptiden, die alle eine gemeinsam verwendete zentrale Peptidkette aufweisen, die aus ungefähr 120 hoch konservierten Aminosäureresten besteht und an ihrem N- und C-terminalen Ende von unterschiedlichen variablen Peptidketten ergänzt wird.

Die räumliche Anordnung der Zentralregion ist vor allem über die Beta-Faltblattstruktur mit einigen Schleifenbildungen erklärt [15].

Ausgehend von phylogenetischen Untersuchungen wurden 7 Subfamilien der menschlichen FGF's identifiziert. Die FGF-19 Subfamilie umfasst 3 Proteine: FGF-19, FGF-21 und FGF-23.

## **2.2.3 Physiologische Funktionen von FGF beim Menschen**

### ***2.2.3.1 Funktionen der FGF-19-Subfamilie***

FGF-19, FGF-21 und FGF-23 erfüllen verschiedene physiologische Funktionen. Die physiologische Hauptfunktion des FGF-23 ist die Regulierung des Phosphat-Stoffwechsels im Sinne einer Anpassung der renalen Phosphat-Elimination an die orale Phosphataufnahme mit dem Ziel konstanter Serum-Phosphat-Spiegel. FGF-19 inhibiert die Translation des Enzyms Cholesterol-7- $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1), das den geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt der Gallensäuresynthese darstellt. FGF-21 spielt bei der Glucose-Aufnahme in Fettzellen eine Schlüsselrolle [16].

### ***2.2.3.2 Subfamilienspezifische Eigenschaften***

Als Alleinstellungsmerkmal verfügen die Proteine der FGF-19-Subfamilie (FGF-19, FGF-21, FGF-23) in der Abgrenzung zu anderen FGF-Subfamilien über eine subfamilienspezifische Disulfid-Brücke, die eine zentrale Rolle in der Stabilisierung der atypischen Beta-Faltblattstruktur spielt. Diese spezifische atypische Beta-Faltblattstruktur unterscheidet sich wesentlich vom gewöhnlichen Beta-Faltblattaufbau der Zentralregion anderer FGF-Proteine. Durch diese Modifikation in der Protein-Konformation ist eine Allosterie bedingt, die möglicherweise als Erklärung der geringeren Bindungsaffinität zu Heparin dienen kann [11;15]. Während FGF-Proteine anderer Subfamilien vor allem an die Heparin-Sulfat-Gruppe, die an der Zelloberfläche der produzierenden Zellen exprimiert ist, binden und dann parakrin wirken, können die Proteine der FGF-19-Gruppe im Gefäßsystem verteilt werden und an unterschiedlichen Zielstrukturen im gesamten Organismus systemische Effekte auslösen [11;17].

## **2.2.4 FGF-23**

### **2.2.4.1 Biochemischer Aufbau von FGF-23**

FGF-23 ist eine Proteinkette, die aus 251 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 26 kDa aufweist. Die Aminosäuresequenz besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (Aminosäuren 1 - 24), der eigentlichen funktionellen Aminosäuresequenz (Aminosäuren 25 - 180) und einer C-terminalen, langen subfamilienspezifisch variierten Sequenz. Die biologisch aktive Sequenz entsteht durch die Aktivität einer Proprotein-Convertase vom Sustilin-Typ [18;19]. Die biologische Halbwertszeit im systemischen Blutkreislauf liegt bei gesunden Individuen um eine Stunde [20]. Seine funktionelle Wirkung vermag FGF-23 durch Bindung an seinen membranständigen Rezeptor insbesondere bei Anwesenheit des Co-Rezeptors Klotho auszuüben.

### **2.2.4.2 Klotho-Co-Faktor und FGF-Rezeptoren**

#### *2.2.4.2.1 Biochemischer Aufbau des Klotho-Co-Faktors*

Klotho ist eine 130 kDa  $\beta$ -Glucuronidase, die transmembran exprimiert ist und  $\beta$ -Steroid-Glucocorticoide hydroxylieren kann. Klotho wurde 1977 erstmals von Kuro-o et al. [21] beschrieben. Die Transkription und Translation von Klotho konnte vorwiegend in renalen Tubuluszellen, Zellen der Nebenschilddrüse und Zellen des Plexus choroideus [22] nachgewiesen werden [11].

Klotho-defiziente Mäuse zeigten einen beschleunigten Alterungsprozess und eine aggravierte generalisierte Arteriosklerose.

#### *2.2.4.2.2 FGF-Rezeptoren – Struktur und Expression*

Der FGF-Rezeptor FGF-R besteht aus einer extrazellulären Domäne, die in 3 Subdomänen eine strukturelle Verwandtschaft zu Immunglobulinen aufweist, sowie einer intrazellulären Proteinstruktur, die funktionell mit der Tyrosinkinase interagiert. Durch alternatives RNA-Splicing werden multiple FGF-Rezeptor-Isoformen generiert [11].

Die Isoformen 1 - 4 zeichnen sich durch eine hohe Aktivität der Tyrosinkinase aus. Die extrazellulären Domänen des FGF-R-1 und FGF-R-2 bestehen entweder aus

zwei oder drei Immunglobulin-G-ähnlichen Strukturen, die gemeinsam das allosterische Zentrum zur Bindung von Liganden bilden. Durch alternatives Splicing der codierenden RNA entstehen Epithel- und Mesenchym-spezifische Isoformen [23;24;25].

#### *2.2.4.2.3 Zusammenspiel von FGF-23, FGF-R und Klotho*

Nachdem FGF-23-defiziente Mäuse ähnliche Phänotypen wie Klotho-defiziente Mäuse aufwiesen [11;26;27], wurde eine gemeinsame pathophysiologische Endstrecke in der Signalkaskade vermutet. So konnte gezeigt werden, dass FGF-23 an den FGF-Rezeptor mit höherer Affinität bei gleichzeitiger Anwesenheit von Klotho (als funktionellem Co-Faktor) binden kann als FGF-23 alleine [28].

Klotho weist eine hohe Bindungsaffinität zu den FGF-Rezeptoren FGF-R-1 bis FGF-R-4 mit einer Präferenz für die mesenchymalen Isoformen auf [11]. Im Zusammenspiel von Klotho und FGF-23 am FGF-Rezeptor kommt es zur Induktion der Tyrosinkinase-abhängigen Phosphorylierungs- und Aktivierungskaskade.

#### **2.2.4.3 Physiologische Funktionen von FGF-23 bei Nierengesunden**

In erster Linie wird FGF-23 von Osteoblasten synthetisiert sowie in die Blutbahn sezerniert und dient der Aufrechterhaltung einer Phosphathomöostase. Ob FGF-23 an der kurzfristigen Regulation der Phosphatstoffwechsels beteiligt ist oder erhöhte FGF-23-Werte eher eine mittel- bis langfristig gestörte Phosphathomöostase reflektieren, ist aktuell noch nicht klar. Die physiologischen Regulationsvorgänge werden genauer in Kap. 2.2.4.4.3 erläutert.

#### **2.2.4.4 Pathophysiologische Funktionen von FGF-23 bei chronisch nierenkranken Patienten**

##### *2.2.4.4.1 Konventionelle Vorstellung des sekundären Hyperparathyreoidismus*

In der konventionellen Modellvorstellung entsteht die renale Form eines sekundären Hyperparathyreoidismus als Folge steigender Phosphat-Spiegel bei abnehmender renaler Clearance und kompensatorischer Erhöhung des Parathormons zur Steigerung der Phosphat-Ausscheidung.

Darüber hinaus trägt zur Stimulation der Parathormon-Sekretion eine mangelnde Synthese von Calcitriol bei. Diese verminderte Vitamin D<sub>3</sub>-Bildung bedingt einerseits eine konsekutive Abnahme des supprimierenden Effektes von Vitamin D<sub>3</sub> auf die Biosynthese von Parathormon in der Nebenschilddrüse, und andererseits eine verminderte gastrointestinale Calcium-Resorption, welche wiederum über eine konsekutive Senkung des Serum-Calcium-Spiegels in einer weiteren Stimulation der Parathormon-Sekretion mündet [11].

Während in fortgeschrittenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz der Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel über eine verminderte renale Syntheseleistung erklärt wird, scheitert dieses Modell in Phasen milder bis moderater Niereninsuffizienz, in denen auch bezüglich anderer renaler Synthesevorgänge (Erythropoetin etc.) keine wesentliche Kompromittierung vorliegt. Es kann hier keine Stellgröße benannt werden, die zu einer derartig ausgeprägten Suppression der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel (mit konsekutivem Hyperparathyreoidismus) führt.

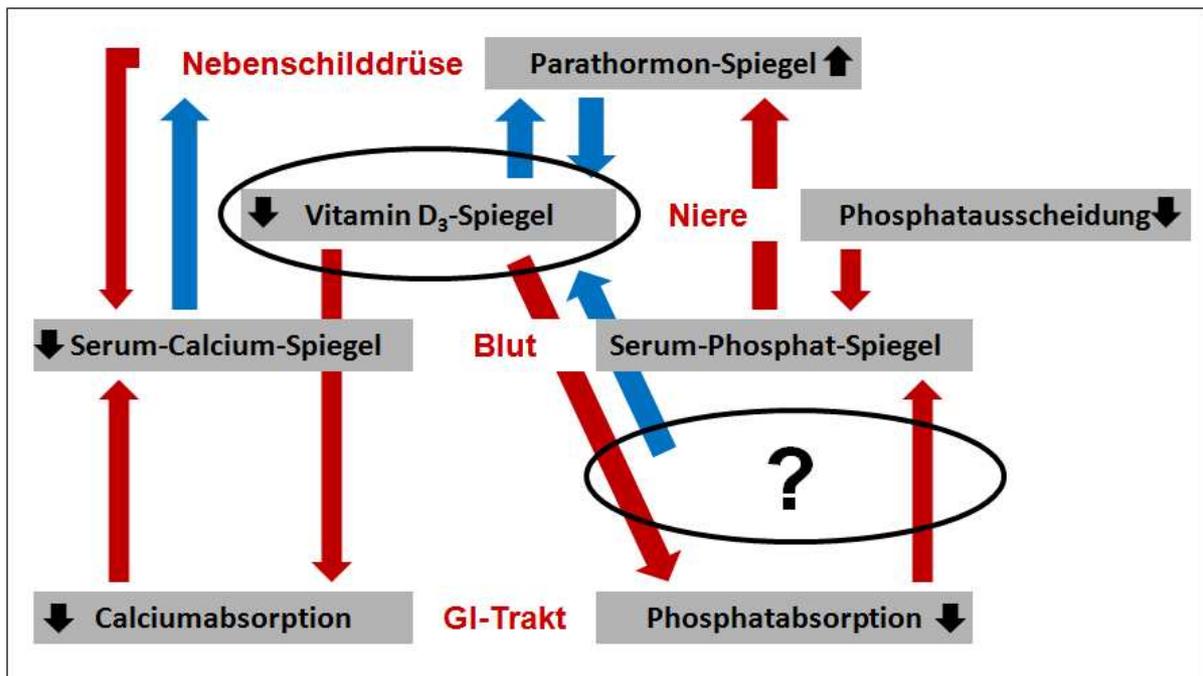


Abb. 1: Illustration der konventionellen Vorstellung der Genese eines renal bedingten sekundären Hyperparathyreoidismus. Rote Pfeile illustrieren eine gleichsinnige, blaue Pfeile eine gegensinnige Wechselwirkung der benannten Stellgrößen. Die kleinen schwarzen Pfeile veranschaulichen die bei chronischer Nierenerkrankung typischerweise messbaren Veränderungen.

Selten tritt ein sekundärer Hyperparathyreoidismus bei normaler Nierenfunktion auf, welcher enteral durch ein Malassimilationssyndrom mit verminderter Calcium-



Diese Lücke in der Modellvorstellung kann über das schon in frühen Stadien einer chronischen Niereninsuffizienz erhöhte FGF-23 [31] und dessen physiologischer Wirkung geschlossen werden, welche eine Hemmung der Synthese von Vitamin D<sub>3</sub> umfasst. Da FGF-23 bereits in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung ansteigt, sind die Calcitriol-Spiegel in stärkerem Maße gesenkt, als dies aufgrund des Verlustes funktioneller Nephrone zu erwarten wäre. Dieser Calcitriol-Mangel bewirkt direkt und indirekt über eine verminderte gastrointestinale Calcium-Resorption mit konsekutiver Hypocalciämie eine vermehrte Parathormon-Bildung [32].

So nimmt FGF-23 für die Erklärung eines sekundären Hyperparathyreoidismus in den Frühstadien einer chronischen Niereninsuffizienz eine Schlüsselrolle ein: erhöhte FGF-23-Spiegel sind zur Aufrechterhaltung einer Normophosphatämie bei durch die Niereninsuffizienz bedingter Phosphatretention erforderlich. Die niedrigeren Calcitriol-Spiegel mit der Konsequenz dadurch erhöhter Parathormon-Sekretion als Folge erhöhter FGF-23-Spiegel werden als untergeordnete Stellgrößen zugunsten der Normophosphatämie in Kauf genommen.

#### 2.2.4.4.3 FGF-23 und Phosphathaushalt

Die renale Phosphatelimination wird physiologisch hauptsächlich durch die proximalen Tubuszellen gesteuert. Diese exprimieren einen Na/Pi Typ II Co-Transporter an ihrer apikalen Membran, der die Phosphatausscheidung reguliert [33]. Der Hauptanteil der renalen Phosphat-Reabsorption wird über den Subtyp des Na/Pi Typ IIa Co-Transporters vermittelt, während ca. 30 % der Phosphationen-Reabsorption über den Subtyp des Na/Pi Typ IIc Co-Transporters vermittelt wird [34].

FGF-23 übt seinen phosphaturischen Effekt über eine Reduktion der Expression des Na/Pi Typ IIa Co-Transporters an der apikalen Membran der proximalen Tubuluszelle aus [35].

Hohe FGF-23-Spiegel können bei fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankung als physiologischer Kompensationsversuch gegenüber einer abnehmenden Zahl von intakten Nephronen interpretiert werden, um die Phosphatausscheidung an den weniger vorhandenen noch funktionierenden Glomerula zu steigern und dadurch die Serum-Phosphat-Spiegel konstant zu halten. Die Folgen sind eine gesteigerte Phosphat-Ausscheidung im Urin sowie eine Verminderung der Calcitriol-Synthese mit indirekter Inhibition der intestinalen Phosphat-Absorption.

Als zusätzlich möglicher Wirkungsort des FGF-23 wird eine verminderte gastrointestinale Resorption von Phosphat durch eine FGF-23-vermittelte Reduktion der Expression des Na/Pi Typ IIb Co-Transporters in den intestinalen Schleimhäuten diskutiert [36].

Dank dieser Regulationsmechanismen weisen die meisten Patienten mit chronischer Nierenerkrankung erst bei terminaler Niereninsuffizienz (K/DOQI 5) erhöhte Phosphat-Spiegel auf, wenn der phosphaturische Effekt der FGF-23-Sekretion aufgrund eines Mangels an funktionsfähigen Glomerula versagt.

So kann man bei Dialyse-Patienten eine bis zu 100-fach erhöhte FGF-23-Sekretion - dem frustrierten Versuch, die Phosphathomöostase zu erhalten, entsprechend - messen [37].

#### 2.2.4.4.4 Interaktion von FGF-23 und Parathormon

Sowohl FGF-23 als auch Parathormon fördern die renale Phosphatausscheidung in ähnlicher Art und Weise, nämlich über eine Reduktion der Phosphatreabsorption mittels Reduktion der Expression des Na/Pi Typ IIa Co-Transporters. Die Wirkung beider Hormone ist jedoch funktionell voneinander unabhängig: In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass selbst nach Parathyreoidektomie der phosphaturische Effekt von FGF-23 nachweisbar war [38]. Ob es einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen der Regulation von Parathormon und FGF-23 gibt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Da FGF-Rezeptoren und Klotho in der Nebenschilddrüse exprimiert werden, liegt die Vermutung eines funktionellen Regelkreises zwischen Parathormon und FGF-23 nahe. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass *in-vitro*-Versuche eine FGF-23-abhängige Reduktion der Parathormon-Transkription und der Parathormon-Sekretion zeigten [39].

#### 2.2.4.4.5 Interaktion von FGF-23 und Calcitriol

Während für die direkten phosphaturischen Effekte an der proximalen Tubuszelle wesentlich höhere FGF-23-Spiegel notwendig sind, können schon niedrigere FGF-23-Spiegel eine indirekte Senkung des Serum-Phosphats über eine Reduktion von Calcitriol bewirken [11].

In einem negativen Feedbackmechanismus bewirken hohe FGF-23-Spiegel eine Reduktion des Serum-Calcitriols. Einerseits hemmt FGF-23 die renale Expression des

geschwindigkeitsbestimmenden Schlüsselenzyms der Calcitriol-Synthese (1- $\alpha$ -Hydroxylase) und andererseits steigert FGF-23 auch die Expression des Enzyms 24-Hydroxylase, das eine zentrale Funktion im Abbau von Calcitriol erfüllt [40]. Korrelierend zu dieser Wechselwirkungsvorstellung zeigen sich bei homozygot FGF-23-defizienten transgenen Mäusen signifikant erhöhte Phosphat- und Calcitriol-Spiegel, die in der Folge zu einer starken Calcifizierung von Gefäßen und Geweben [1] und konsekutiv zu einer Erhöhung der Sterblichkeit bei diesen homozygot FGF-23-defizienten Mäusen führen, wobei die erhöhten Phosphat-Spiegel stärker zu dieser Calcifizierung beitragen als erhöhte Calcitriol-Spiegel [41]. In einem Regelkreis vermag umgekehrt Calcitriol an einer Vitamin-D<sub>3</sub>-abhängigen Region des FGF-23-Genpromoters zu binden und somit die FGF-23-Konzentration zu erhöhen [11].

## **3 Patientenkollektiv und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

Im Zeitraum zwischen März und Oktober 2004 wurden 152 Patienten in eine prospektive Kohortenstudie eingeschlossen. Alle Patienten waren an der nephrologischen Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes angebunden und erklärten vor Studieneinschluss ihr Einverständnis zur Teilnahme. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes bewilligt.

### **3.2 Ausschlusskriterien**

Bei der primären Datenerhebung 2004 wurden Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Dialysetherapie und Patienten nach stattgehabter Nierentransplantation ausgeschlossen.

### **3.3 Datenakquisition**

#### **3.3.1 Studieneinschluss**

Mit einem standardisierten Fragebogen wurde bei Studieneinschluss nach Lebensgewohnheiten (Rauchen), kardiovaskulärer Komorbidität, prävalentem Diabetes mellitus sowie aktueller Medikation gefragt. Die anamnestischen Angaben zur Komorbidität wurden mittels Patientenakten und Arztbriefen verifiziert.

Als kardiovaskuläre Komorbidität wurden folgende Punkte definiert: stattgehabter Myokardinfarkt, Koronarangiographie mit Stent-Implantation oder Ballondilatation, koronare Bypass-Operation, Apoplex, Thrombendarterektomie oder Stenting der Carotiden, nicht traumatische untere Extremitätenamputation, peripherarterielle Bypass-Operation, Ballondilatation oder Stenting an den Arterien der unteren Extremität.

Als aktive Raucher wurden Patienten eingestuft, die zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses entweder rauchten oder weniger als einen Monat zuvor aufgehört hatten zu rauchen.

Als Diabetiker wurden die Patienten mit prävalentem Diabetes mellitus in der Eigen- oder Fremdanamnese, mit antidiabetischer Medikation und/oder mit spontan gemessenem Blutzuckerwert über 200 mg/dl oder Nüchtern-Blutzuckerwert über 126 mg/dl bei Studieneinschluss definiert.

Zur Errechnung des Body Mass Index (BMI) wurden Gewicht und Körpergröße registriert. Der Body Mass Index wurde nach der Formel  $\text{BMI} [\text{kg}/\text{m}^2] = \text{Körpergewicht} [\text{kg}] / \text{Körpergröße}^2 [\text{m}^2]$  berechnet. Systolische und diastolische Blutdruckwerte wurden konventionell manuell nach Riva Rocci gemessen.

Die Erhebung der Patientendaten bei Studieneinschluss erfolgte im Rahmen einer separaten Dissertationsarbeit (Reichart B, [42]). Der Verfasser der vorgelegten Dissertation hat auf der Basis dieser bei Studieneinschluss erhobenen Daten eine strukturierte Follow-Up-Untersuchung durchgeführt.

### 3.3.2 Follow-Up

Basierend auf den Daten bei Studieneinschluss 2004 wurden in einem ersten Schritt als Grundlage der weiteren Datenakquisition vollständige Tabellen mit den Kontaktdaten der Patienten des Studienkollektives, der betreuenden Haus- und Fachärzte mit entsprechenden Kontaktmöglichkeiten durch Recherchen im universitätsinternen SAP<sup>®</sup>-System und öffentlicher Datenquellen generiert. Ebenfalls wurde erfasst, welche Patienten im Beobachtungszeitraum weiterhin regelmäßig an die nephrologische Ambulanz angebunden waren. Die entsprechenden Ambulanzakten wurden zur Datenerhebung hinzugezogen.

Nachfolgend wurden alle Patienten durch telefonische Befragung kontaktiert. Mit einem standardisierten Fragebogen wurde nach kardiovaskulären Ereignissen seit dem initialen Studieneinschluss 2004 in für medizinische Laien verständlicher Art und Weise gefragt (vgl. Anhang Datenerhebungsbogen). Im Fall fehlender oder inkompletter Patientenangaben und gleichzeitig fehlender Informationen im SAP<sup>®</sup>-System des Universitätsklinikums des Saarlandes wurden bei Vorliegen des Einverständnisses der Patienten ihre jeweiligen Haus- und Fachärzte telefonisch und/oder schriftlich befragt.

Folgende Daten wurden erfasst:

Das Auftreten von Myokardinfarkten; stattgehabte koronare Bypass-Operation; stattgehabte perkutane Koronarintervention; stattgehabter Apoplex mit neurologischen

Defiziten (Sprachstörungen oder motorische Defizite über 24 Stunden); Thrombendarterektomie oder Katheterintervention an den Carotiden oder operative bzw. interventionelle Revaskularisationen der Becken- oder Beinarterien; stattgehabte nicht-traumatische Amputation der unteren Extremität.

Neben dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wurde bei der Follow-Up-Untersuchung erfasst, ob eine Dialysepflichtigkeit eingetreten ist.

Da die meisten Patienten an die nephrologische Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes bei Studienbeginn angebunden waren, konnten über die klinikintern vorhandenen Daten die anamnestischen Angaben der Patienten ergänzt und zusätzlich validiert werden. Insbesondere lagen so bei den meisten Patienten kontinuierliche regelmäßige Aufzeichnungen der Nieren-Retentionsparameter vor.

### **3.3.3 Datenaufbereitung**

Alle erhobenen Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel tabellarisch zur weiteren Analyse erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics 13.0.1 und 17.0 (vgl. Kap. 3.5).

### **3.3.4 Endpunktdefinitionen**

Als Endpunkte wurde die Gesamtmortalität sowie differenziert die renale Morbidität und die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität betrachtet.

Kardiovaskuläre Endpunkte:

Als kardiovaskuläre Ereignisse vordefiniert waren das Auftreten von Myokardinfarkten, koronaren Bypass-Operationen, koronarangiographischen Interventionen (Ballondilatationen, Stent-Implantationen), Apoplexien mit sensiblen Ausfällen, Aphasie oder motorischen Paresen, die länger als 24 Stunden andauert haben, operative oder interventionelle Interventionen an den Aa. carotides, Interventionen an den Becken- oder Beinschlagadern (Stent-Implantationen, Ballondilatationen, Thrombendarterektomie, Bypass-Operationen) und nicht traumatische Amputationen der unteren Extremität.

Renale Endpunkte:

Beginn einer chronischen Dialysepflichtigkeit im Beobachtungszeitraum, die über mindestens 4 Wochen fortgesetzt worden ist, oder eine Reduktion der geschätzten (estimated) glomerulären Filtrationsrate (eGFR) auf 50% im Vergleich zum Studieneinschluss.

Eine passagere Reduktion der eGFR um mehr als 50% mit konsekutiver Erholung wurde nicht als renaler Endpunkt gewertet.

## 3.4 FGF-23-Messungen

### 3.4.1 Material

Bei allen im Studienkollektiv eingeschlossenen Patienten wurden zu Studienbeginn Blutproben unter standardisierten klinischen Bedingungen asserviert. Etablierte Laborparameter wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes mit standardisierten Methoden bestimmt (Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Parathormon, Harnstoff, Calcium und Phosphat). Zudem wurden Serumproben mittels Zentrifugation mit 4000 rpm über 5 min asserviert und zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

Die Proteinurie wurde mit konventionellen Methoden bestimmt. Die glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wurde mit der 4-Variablen-MDRD-Formel abgeschätzt [43].

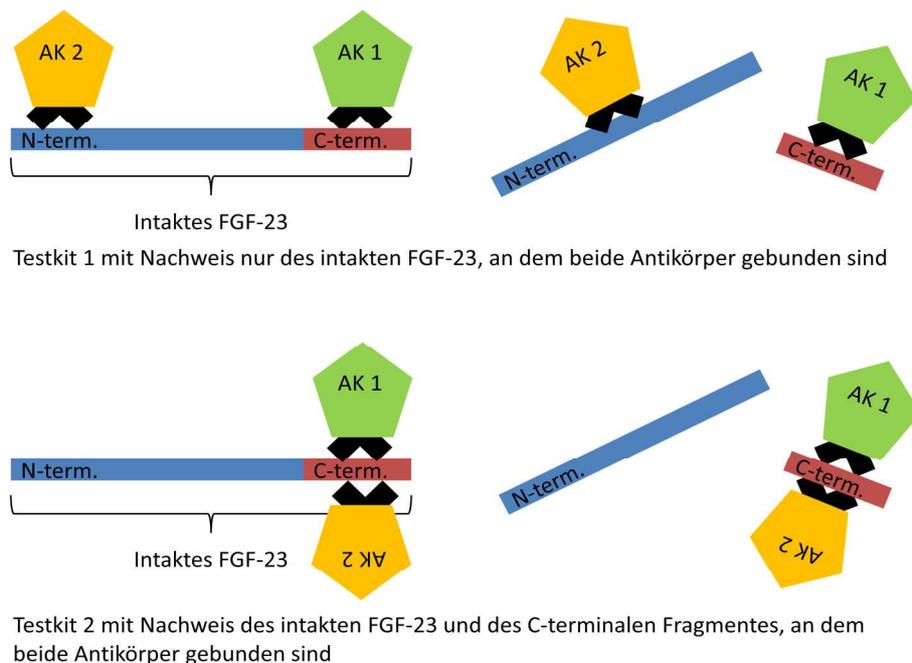
$$eGFR_{[ml/min/1,73m^2]} = 186 \times \text{Serum-Kreatinin}_{[mg/dl]}^{-1,154} \times \text{Alter}_{[Jahre]}^{-0,203} \times 0,742_{\text{nur bei Frauen}} \times 1,21_{\text{bei Patienten mit schwarzer Hautfarbe}}$$

Die C-terminalen FGF-23-Spiegel wurden aus archivierten Plasma-Proben mittels eines im hiesigen nephrologischen Labor etablierten ELISA's gemessen (Immunotopics, San Clemente, CA, USA).

### 3.4.2 Prinzipien verfügbarer Nachweisverfahren für FGF-23

Aktuell sind 2 Test-Kits, die auf unterschiedlichen Methoden basieren, um menschliches FGF-23 zu messen, kommerziell erhältlich. Die verschiedenen Nachweisverfahren sind in untenstehender Abbildung 3 illustriert.

1. Mittels Sandwich-ELISA wird das gesamte Molekül mit kompletter Aminosäuresequenz erfasst. Durch die simultane Bindung zweier monoklonaler Antikörper am C- und N-terminalen Ende kann spezifisch das intakte Protein nachgewiesen werden.
2. Weiterhin besteht die Möglichkeit, nur das C-terminale Fragment von FGF-23 mittels ELISA zu messen, welches sowohl das intakte Protein als auch das C-terminale Fragment erfasst.



*Abb. 3: Unterschiedliche Nachweismethoden für FGF-23. Für einen Nachweis ist die simultane Bindung beider Antikörper (AK1 und AK2) notwendig. Während bei Test-Kit 1 nur das intakte FGF-23 nachgewiesen wird, weist das unspezifische Test-Kit 2 auch das C-terminale Fragment nach und kann nicht zwischen intaktem FGF-23 und Spaltprodukten differenzieren.*

### 3.4.3 Nachweismethode des verwendeten Test-Kits

Das verwendete ELISA Test-Kit von Immunotopics (San Clemente, CA, USA) in der 1. Generation weist menschliches FGF-23 durch Bindung zweier polyklonaler Anti-

körper an das C-terminale Ende von FGF-23 an zwei unterschiedlichen, die gegenseitige Bindung nicht behindernden Loci nach, indem es die etablierten Verfahren des Sandwich-ELISA nutzt.

Ein Antikörper ist an Biotin gebunden, der andere Antikörper ist mit einem zum Nachweis erforderlichen Enzym (HRP, horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase) konjugiert.

Die Plasma-Probe wird seriell mit beiden Antikörpern in einem mit Streptavidin beschichteten Mikrotiter-Well inkubiert. Es bildet sich dann die typische Sandwich-Anordnung (vgl. Abb. 4). Nachdem die ungebundenen Antikörper ausgewaschen sind, kann durch die Meerrettich-Peroxidase vermittelte Oxidation eines zugesetzten Chromogens (Tetramethylbenzidin) ein Farbumschlag erzielt werden, der photometrisch erfasst werden kann. Aus der Farbintensität kann dann auf die Menge des gebundenen Enzyms Meerrettich-Peroxidase und damit indirekt auf die Menge des in der Probe vorhandenen FGF-23 geschlossen werden [44].

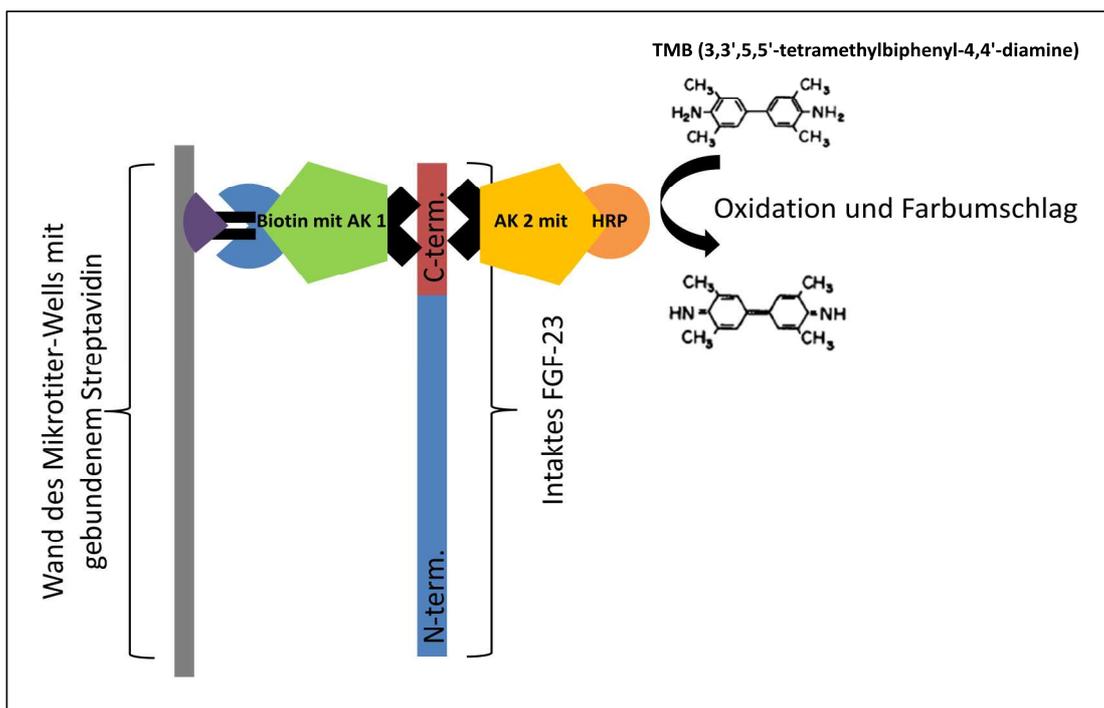


Abb. 4: Illustration der Nachweismethode für FGF-23 mittels Sandwich-ELISA und photometrischer Messung. Zwei Antikörper (AK 1 und AK2) binden an unterschiedlichen Stellen gleichzeitig am C-terminalen Ende von FGF-23. Der erste Antikörper (AK1) ist mit Biotin gekoppelt. Biotin vermittelt eine sehr starke nicht-kovalente Bindung an Streptavidin, das an der Wand des Inkubationsgefäßes gebunden ist. Der zweite Antikörper (AK2) ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert. Dieses Enzym oxidiert das zugesetzte Tetramethylbenzidin (TMB), was zu einem Farbumschlag der Substanz führt, der photometrisch erfasst werden kann.

Meerrettich-Peroxidase ist eine Oxireduktase, die die Oxidation organischer Substrate unter Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wasserstoffperoxid) katalysiert. Meerrettich-Peroxidase ist ein Enzym, von dem natürlich mindestens 7 Isoenzyme existieren und das ein Molekulargewicht um 44000 kDa aufweist. Die Quartärstruktur ergibt sich durch komplexe Anlagerung einer Hämgruppe, Calcium-Kationen und Kohlenhydratgruppen um die räumlich angeordnete Proteinstruktur aus ca. 300 Aminosäureresten. Die Oxidation des zugesetzten Chromogens Tetramethylbenzidin (vgl. Abb. 4) führt dabei zu einem Farbumschlag, der photometrisch erfasst werden kann. Dieser enzymatisch katalysierte Oxidationsprozess folgt näherungsweise der Michaelis-Menten-Kinetik für Enzym-Substrat-Reaktionen erster Ordnung und beschreibt damit eine hyperbole Sättigungskurve der maximalen Enzym-Umsatzgeschwindigkeit als Funktion der vorhandenen Substratkonzentration [45].

Die Gesamtgleichung der durch Meerrettich-Peroxidase katalysierten Reaktion lautet:



Die Kinetik folgt dabei nicht ganz genau dem einfachen Modell von Michaelis-Menten, da es sich um einen mehrstufigen Prozess handelt. Zunächst erfolgt die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus Peroxidase und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Anschließend reagieren zwei Moleküle des H-Donors (TMB) in zwei Schritten mit dem Enzym-Substrat-Komplex (die oxidierte Meerrettich-Peroxidase), und es erfolgt die Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes zu den Produkten. Dabei entsteht das regenerierte Enzym, das reduzierte Substrat ( $2 \text{H}_2\text{O}$ ) und der oxidierte Donor TMB [45].

Aufgrund der guten Korrelation von intaktem und C-terminalem Assay eignen sich beide Assays, die Aktivität von FGF-23 zu bestimmen [54;55] und die Messung eines der beiden Parameter erscheint ausreichend.

Tiefgefrorene und über eine längere Zeit asservierte Proben zeigen bei der Bestimmung des C-terminalen FGF-23 stabilere Ergebnisse mit besserer Linearität und Inter-Assay-Variabilität als bei der Messung des intakten FGF-23 [46]. Ebenso zeigt sich eine Überlegenheit hinsichtlich der Reliabilität der Messergebnisse bei Verwendung von Plasma- statt Serumproben [46].

Daher haben wir das C-terminale FGF-23 in Plasma-Proben bestimmt.

### 3.4.4 Technisches Vorgehen

Die Messungen aller Proben wurden unverzüglich nach dem Auftauen der Proben gemäß dem vom Hersteller empfohlenen, im Anschluss aufgeführten Protokoll gemessen. Die Kontroll- und Standardmessungen wurden im selben Probenansatz durchgeführt. Den verfahrenstechnischen Limitationen auf enzymkinetischer (und photometrischer) Ebene wurden durch das Erstellen einer empirischen versuchsspezifischen Eichkurve zur korrekten Interpretation Rechnung getragen.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

1. Ausgangsmaterial Lithium-Heparin-Plasma, das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert wurde, und bei dem vor dem Einfrieren durch fünfminütige Rotation bei 4000 rpm das Plasma von übrigen zellulären und partikulären Bestandteilen wie z. B. Fibringerinseln, die eine nicht spezifische Bindung an der Gefäßoberfläche und damit falsch zu hohe Messwerte verursachen können, oder z. B. Lipidakkumulationen, die die Antikörperbindung beeinflussen können, getrennt und im Anschluss abpipettiert worden war.
2. Probenansatz mit 150  $\mu\text{l}$  Probenplasma im Streptavidin-beschichteten 96-Mulden-Mikrotiter-Well (Standardreihen, Kontrollseren, Plasma-Proben der Probanden)
3. Hinzugabe von 50  $\mu\text{l}$  Lösung des biotingebundenen Antikörpers
4. Abdeckung mit Deckglas und handelsüblicher Aluminiumfolie (Lichtschutz)
5. Inkubation bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte bei 200 rpm für 10 min, dann stationär für 24 h
6. Abpipettieren der Lösungen und anschließend fünfmaliges Auswaschen der Mikrotiter-Wells mit je 350  $\mu\text{l}$  Waschlösung (1:20-Verdünnung des Waschpufferkonzentrates mit destilliertem Wasser), Abpipettieren der gesamten Waschlösung
7. Hinzugabe von 200  $\mu\text{l}$  HRP-Antikörperlösung
8. Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min
9. Fünfmaliges Auswaschen mit 350  $\mu\text{l}$  Waschpufferlösung (vgl. Schritt 6)
10. Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  HRP-Substratlösung (Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid)
11. Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min

12. Photometrische Messung der Absorption bei 595 nm an luftblasenfreien Proben, Subtraktion der Absorption des 0 RU/ml-Standard-Wells von allen erhaltenen Werten
13. Hinzugabe von 50 µl ELISA-Stopp-Lösung (einmolare Schwefelsäure) in jedes Mikrotiter-Well, Inkubation bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte bei 200 rpm für 1 min
14. Photometrische Messung der Absorption bei 450 nm an luftblasenfreien Proben, Subtraktion der Absorption eines Standard-Mikrotiter-Wells (mit 150 µl HRP-Substratlösung und 50 µl ELISA-Stopp-Lösung) von allen erhaltenen Werten

### 3.4.5 Photometrische Messungen

Die Messungen wurden mit Hilfe des Photometers TECAN sunrise durchgeführt.

Physikalische Grundlage der photometrischen Nachweismethode stellt das Lambert-Beer'sche Gesetz dar, das die konzentrationsabhängige Abschwächung monochromatischen Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch eine bestimmte Substanz beschreibt.

Die Extinktion  $E_\lambda$  (Absorbanz des Materials für Licht der Wellenlänge  $\lambda$ ) ist nach dem Gesetz von Lambert-Beer gegeben durch:

$$E_\lambda = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

$I_1$  Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$  Intensität des einfallenden Lichtes

$\epsilon_\lambda$  Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ . Dieser ist eine für die absorbierende Substanz spezifische Größe und hängt auch vom Lösungsmittel, z.B. pH-Wert ab.

$c$  Konzentration des absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

$d$  Dicke der Küvette

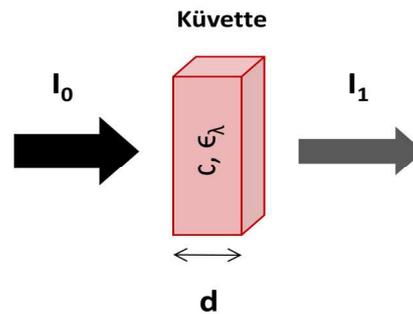


Abb. 5: Abhängigkeit der Intensität des einfallenden monochromatischen Lichtes ( $I_0$ ) und durch die Probe durchtretende Lichtintensität ( $I_1$ ) von der Konzentration ( $c$ ) einer Substanz, der Dicke der Küvette ( $d$ ) und einem wellenlängenspezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$ .

Durch die Messung der optischen Extinktion der mitgelieferten Standardlösungen haben wir eine Kalibrierungskurve abgeleitet. Die Messungen wurden bei der Wellenlänge der maximalen spezifischen Extinktion, die empirisch bei dem verwendeten Test-Kit substanzspezifisch bei 450 nm und 595 nm liegt, entsprechend den Herstellerangaben geführt.

Anhand der auf diesen Grundlagen mit Hilfe der zum Photometer dazugehörigen Software Magellan 6 (Tecan) gewonnenen Funktion haben wir aus den Absorptionswerten die entsprechende Konzentration von FGF-23 in den Blutproben der Patienten des Studienkollektives ermittelt.

### 3.4.6 Messtechnische Limitationen des verwendeten Test-Kits

Die verwendete Untersuchungsmethode ermöglicht eine Messung der FGF-23-Spiegel in einer arbiträren, nicht absoluten, relativen Einheit RU/ml (**R**elative **U**nit pro **M**illiliter).

Die folgenden Angaben basieren auf den von Immunotopics mit dem Test-Kit bereitgestellten Informationen: Die Nachweisgrenzen des Verfahrens liegen zwischen 1,5 RU/ml und 1500 RU/ml. Die Sensitivität des verwendeten Testverfahrens wird für die Messung der kein FGF enthaltenen Referenzprobe mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0 RU/ml  $\pm$  1,5 RU/ml, die Präzision bei 20 gemittelten Messungen derselben Probe mit Hilfe eines Test-Kits mit einem Variationskoeffizienten von 2,4 % bei einem mittleren Wert von 33,7 RU/ml und einem Variationskoeffizienten von 1,4 % bei einem mittleren Wert von 302 RU/ml angegeben. Die Präzision bei Verwendung verschiedener Test-Kits liegt im Mittel bei 10 verwendeten Ansätzen mit

einem Variationskoeffizienten von 4,7% bei einem mittleren Wert von 33,6 RU/ml und einem Variationskoeffizienten von 2,4 % bei einem mittleren Wert von 293 RU/ml. Sowohl Messungen von Proben mit Zusatz einer definierten Menge von FGF-23 als auch Messungen von Verdünnungsstufen der Ausgangslösung zeigen bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:8 eine suffiziente und hinreichend genaue Korrelation zwischen erwarteten und gemessenen FGF-23-Spiegeln. Die Vergleichbarkeit von Messungen mit dem Test-Kit der ersten und zweiten Generation ist mit einem Korrelationskoeffizient von 0,978 und einer Steigung der Korrelationskurve von 0,96 gegeben (vergleichende Messung von ca. 100 Patienten mit FGF-23-Werten zwischen 15 RU/ml und 1008 RU/ml mit beiden Test-Kits durch den Hersteller).

### 3.5 Statistische Auswertung

Die in Microsoft Excel zusammengestellten Daten wurden in SPSS Statistics 13.0.1 und 17.0 transferiert, analysiert und illustriert. Einzelne Analysen und graphische Darstellungen wurden mit den in Microsoft Excel implementierten statistischen Instrumenten durchgeführt

Kontinuierliche normalverteilte Variablen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, kontinuierliche nicht normalverteilte Variablen als Median [IQR, Interquartilsabstand], kategorielle Variablen als Anzahl (prozentualer Anteil der Gesamtgruppe) angegeben.

Zur Testung auf signifikante Unterschiedlichkeit wurde bei kontinuierlichen normalverteilten Variablen der Student-T-Test, bei kontinuierlichen nicht normalverteilten Parametern der Mann-Whitney-U-Test herangezogen; kategorielle Variablen wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen.

Die Assoziation zwischen zwei kontinuierlichen Variablen wurde mittels Spearman's Rang-Korrelationskoeffizienten überprüft [47].

Nachfolgend wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Log-Rank-Test berechnet. Das Signifikanzniveau für den Fehler erster Art wurde arbiträr auf  $p < 0,05$  festgesetzt. In einem Cox-Regressionsmodell wurde überprüft, ob eine Assoziation zwischen FGF-23 und kardiovaskulärer Prognose auch nach Korrektur für etablierte Risikofaktoren persistiert.

Mit diesen Annahmen für den Fehler 1. und 2. Art ergeben sich für unser Studienkollektiv mit der Power von ca. 150 Patienten in grober Näherung, dass Unterschiede im

Vergleich zweier gleichgroßer Gruppen dann erfasst werden, wenn die relative Unterschiedlichkeit bei 20-25 % liegt [48;50]. Kleinere Unterschiede werden durch obiges Studiendesign wahrscheinlich übersehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der FGF-23-Messungen

Bei 149 Patienten erfolgte die Bestimmung von FGF-23, bei 3 Patienten konnten aufgrund fehlender Plasma-Proben keine Messwerte ermittelt werden. Die Messwerte lagen im Intervall von 0 RU/ml bis 2000 RU/ml (obere Nachweisgrenze) mit einem Median von 81,6 RU/ml [17,1-267,4 RU/ml].

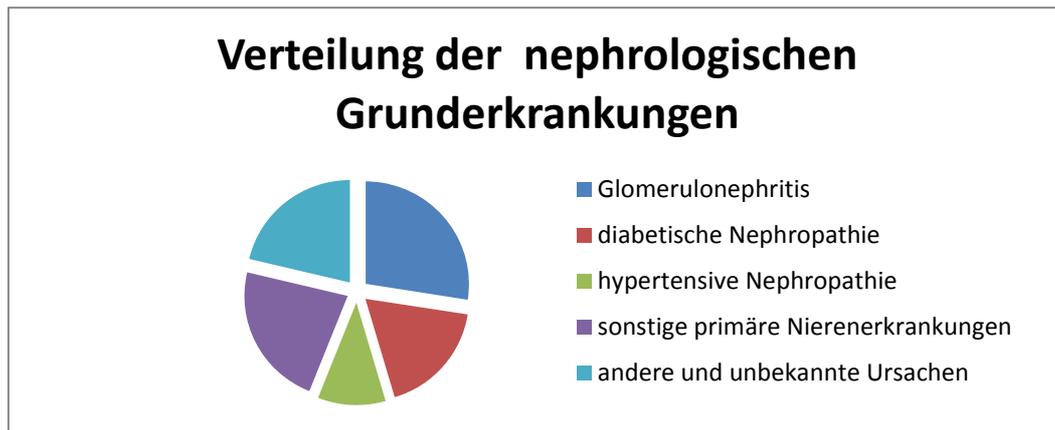
### 4.2 Zusammensetzung und Charakteristika der Studienkohorte

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der untersuchten Studienkohorte in Bezug auf die der chronischen Nierenerkrankung zugrunde liegende Ätiologie.

Grunderkrankung	Anzahl	%
Glomerulonephritis (bioptisch gesichert)	25	16,4
Glomerulonephritis (klinische Diagnose)	18	11,8
diabetische Nephropathie	27	17,8
hypertensive Nephropathie (Nephrosklerose)	16	10,5
autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung	8	5,3
chronische Pyelonephritis	12	7,9
obstruktive Nephropathie	4	2,6
Nephrolithiasis	2	1,3
Schrumpfnieren	3	2,0
Z.n. Lebendnierenspende	3	2,0
Analgetika-Nephropathie	2	1,3
andere und unbekannte Ursachen	32	21,1
<i>gesamt</i>	<i>152</i>	<i>100</i>

Tab. 1: Charakteristik des Studienkollektives, prozentuale Verteilung der renalen Grunderkrankungen

Das folgende Tortendiagramm (Abb. 6) fasst synoptisch wichtige ätiologische Klassen bei chronischer Nierenerkrankung zusammen.



*Abb. 6: Verteilung der Grunderkrankungen im Studienkollektiv unter Zusammenfassung wichtiger Klassen*

Tabelle 2 stellt die weiteren Basischarakteristika der Patientenkohorte bei Studienbeginn 2004 dar.

Die Medikation umfasste bei 56,1 % der Patienten Betablocker, bei ebenfalls 56,1 % Angiotensin-1-Rezeptor-Antagonisten, bei 37,2 % ACE-Inhibitoren und bei 31,8 % Statine. Eine Behandlung mit Erythropoetin-Derivaten bestand bei 14,9 % des Studienkollektives.

Merkmal	n	Mittelwerte	±SD
Alter [Jahre]	152	61	±14,2
Raucher [%]	149	15 (10 %)	
Weiblich [%]	149	69 (46 %)	
Diabetes mellitus [%]	149	46 (31 %)	
Body Mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]	152	29,3	±5,7
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	152	38	±25,0
RR systolisch [mmHg]	152	168	±28
RR diastolisch [mmHg]	152	98	±18
Parathormon im Serum [ng/l]	148	150	±193
FGF-23 im Plasma [RU/ml]	149	Median 81,6	IQR [17,1-267,4]
Gesamtcholesterin im Serum [mg/dl]	152	206	±48
Triglyceride im Serum [mg/dl]	152	208	±132
HDL-Cholesterin im Serum [mg/dl]	152	53	±17
LDL-Cholesterin im Serum [mg/dl]	152	120	±41
Calcium im Serum [mmol/l]	152	2,3	±0,2
Phosphat im Serum [mg/dl]	152	3,8	±1,3
Proteinurie [g/g Kreatinin]	149	1,5	±2,4

Tab. 2: Beschreibung der Basischarakteristika des Studienkollektives. Kontinuierliche normalverteilte Variablen wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung, FGF-23-Spiegel als Median [Interquartilsabstand], kategoriale Variablen als prozentualer Anteil der Gesamtgruppe (n) angegeben.

## 4.3 Korrelationen der Nierenfunktion mit Parametern des Calcium-Phosphat-Metabolismus

### 4.3.1 Etablierte Parameter des Calcium-Phosphat-Metabolismus

Tab. 3 stellt die Korrelationen von Calcium, Phosphat, Parathormon und eGFR dar. Erwartungsgemäß zeigen sich Korrelationen zwischen Ausmaß der Nierenfunktions-einschränkung mit steigendem Parathormon- und Phosphat-Spiegel, nicht jedoch mit den Calcium-Spiegeln.

Rangkorrelation nach Spearman	Serum-Calcium [mmol/l]	Serum-Phosphat [mg/dl]	eGFR [ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ]	Parathormon [ng/l]
Serum-Calcium [mmol/l]	-	$r = -0,051$ $p = 0,534$	$r = 0,182^*$ $p = 0,025$	$r = -0,231^*$ $p = 0,005$
Serum-Phosphat [mg/dl]	$r = -0,051$ $p = 0,534$	-	$r = -0,622^{**}$ $p < 0,001$	$r = 0,511^{**}$ $p < 0,001$
eGFR [ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ]	$r = 0,182^*$ $p = 0,025$	$r = -0,622^{**}$ $p < 0,001$	-	$r = 0,821^{**}$ $p < 0,001$
Parathormon [ng/l]	$r = -0,231^*$ $p = 0,005$	$r = 0,511^{**}$ $p < 0,001$	$r = 0,821^{**}$ $p < 0,001$	-

Tab. 3: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman mit Angabe der Rangkorrelationskoeffizienten  $r$  und des zweiseitigen Signifikanzniveaus  $p$ . \*Der Zusammenhang ist auf dem Niveau  $p < 0,05$  signifikant.

\*\*Der Zusammenhang ist auf dem Niveau  $p < 0,001$  signifikant.

#### 4.3.2 FGF-23

Im untersuchten Studienkollektiv zeigt sich eine positive Korrelation zwischen FGF-23 und Serum-Phosphat ( $R = 0,437$ ;  $p < 0,001$ ), Parathormon-Spiegel ( $R = 0,591$ ;  $p < 0,001$ ) und Serum-Calcium ( $R = 0,195$ ;  $p = 0,017$ ). Abb. 7 illustriert die Korrelationen von FGF-23 mit Serum-Phosphat und Parathormon (aufgrund der nicht normalverteilten Merkmalsausprägung der FGF-23-Werte wird der dekadische Logarithmus der FGF-23-Werte dargestellt).

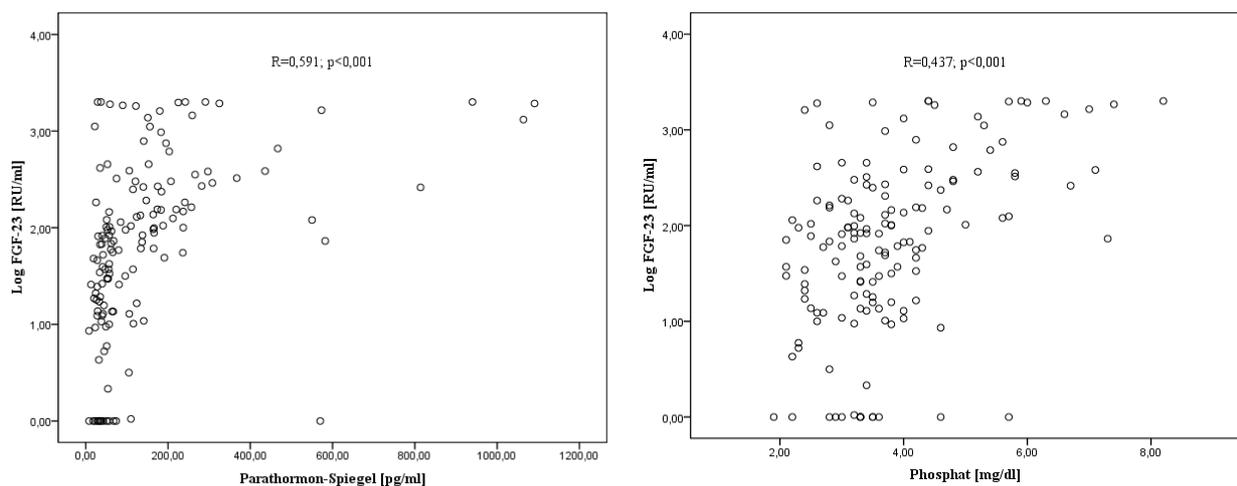


Abb. 7: Darstellung der Abhängigkeit von Parathormon-Spiegel und Phosphat-Werten zu dekadisch logarithmierten FGF-23-Werten.  $R$  = Korrelationskoeffizient. Beide Korrelationen sind auf dem Niveau  $p < 0,001$  signifikant.

Eine Korrelation zwischen FGF-23-Werten und Alter zeigt sich nicht ( $R = 0,118$ ;  $p = 0,151$ ), wohingegen erwartungsgemäß eine positive Korrelation von eGFR und FGF-23-Werten ( $R = 0,603$ ;  $p < 0,001$ ) besteht (Tab. 4).

Rangkorrelation nach Spearman	$\log_{10}$ (FGF-23-Spiegel) [RU/ml]
Serum-Calcium [mmol/l]	$r = 0,195^*$ ; $p = 0,017$
Serum-Phosphat [mg/dl]	$r = 0,437^{**}$ ; $p < 0,001$
Parathormon [ng/l]	$r = 0,591^{**}$ ; $p < 0,001$
eGFR [ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ]	$r = 0,603^{**}$ ; $p < 0,001$
Alter [a]	$r = 0,118$ ; $p = 0,151$

Tab. 4: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman. \*Der Zusammenhang ist auf dem Niveau  $p < 0,05$  signifikant. \*\*Der Zusammenhang ist auf dem Niveau  $p < 0,001$  signifikant.

#### 4.4 Chronische Nierenerkrankung und kumulatives Überleben

Die 152 Patienten wurden im Mittel 3 Jahre nachbeobachtet. Bei 14 Patienten (9,2%) waren telefonisch keine Daten zu akquirieren, da sie die Befragung entweder ablehnten (6 Patienten; 3,9%) oder nicht erreichbar waren (8 Patienten; 5,3%). Ein Patient wurde zum Zeitpunkt einer allogenen Nierentransplantation zensiert.

Bei 27 Patienten (17,8%), bei denen die Telefonbefragung keine ausreichenden Daten ergab, basiert das Follow-Up hauptsächlich auf Auswertung der innerhalb des Universitätsklinikum des Saarlandes erfassten Krankheitsgeschichte (Arztbriefe stationärer Aufenthalte im Beobachtungszeitraum, Verlaufsberichte und Laborwerte der nephrologischen Ambulanz). Bei einem Patienten war kein Follow-Up möglich.

90 Patienten (59,2%) waren im Beobachtungszeitraum an die nephrologische Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes angebunden.

Erwartungsgerecht zeigen Patienten in fortgeschritteneren Stadien der chronischen Nierenerkrankung eine höhere Gesamtsterblichkeit ( $p = 0,007$ ; Abb. 8).

Im Gegensatz dazu erwies sich das Serum-Phosphat nicht als Prädiktor der Gesamtmortalität (Log-Rank-Test nach Stratifizierung der Patienten anhand von Serum-Phosphat in Quartilen,  $p = 0,147$ ).

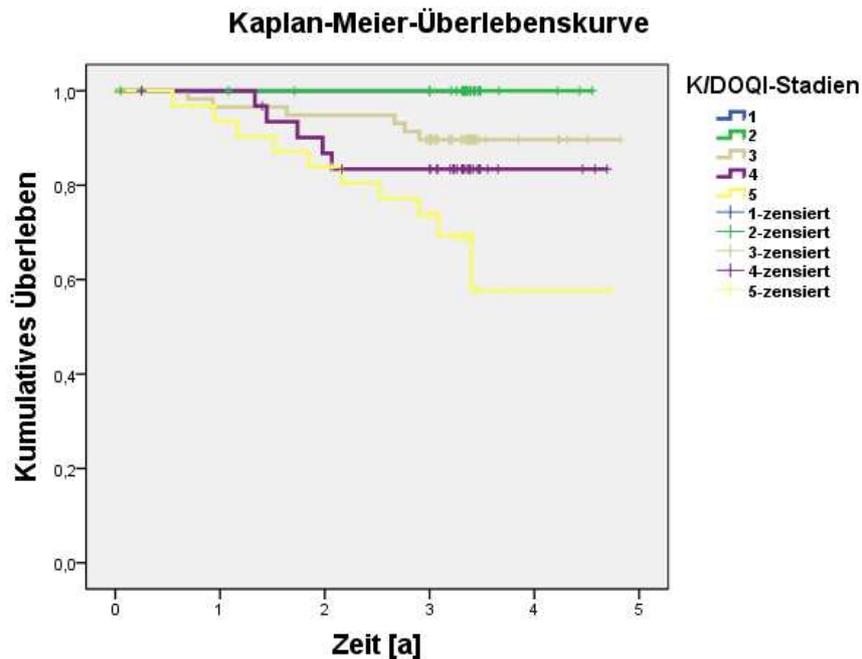


Abb. 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Gesamtsterblichkeit nach K/DOQI-Stadien:  
 Stadium 1 (n=3): eGFR > 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, Stadium 2 (n=27): eGFR 60-89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>,  
 Stadium 3 (n=58): eGFR 30-59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, Stadium 4 (n=32): eGFR 15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>,  
 Stadium 5 (n=31): eGFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. N = 151 (1 Pat. ohne Follow-Up)

## 4.5 Studienendpunkte und FGF-23-Spiegel

### 4.5.1 FGF-23 und renale Endpunkte

Nach einem mittleren Follow-Up von 3 Jahren haben von 152 nachbeobachteten Patienten 50 Patienten einen renalen Endpunkt erreicht, 39 Patienten davon sind im Beobachtungszeitraum chronisch dialysepflichtig geworden, die restlichen 11 Patienten haben eine dauerhafte Reduktion der geschätzten glomerulären Filtrationsrate auf unter 50 % des zu Studienbeginn vorliegenden Niveaus erreicht.

Die nachfolgende Tabelle vergleicht Serum-Phosphat-Spiegel und Plasma-FGF-23-Werte zwischen Patienten mit bzw. ohne eingetretene Dialysepflichtigkeit im Beobachtungszeitraum.

	Phosphat [mg/dl]	FGF-23 [RU/ml]
<b>Keine Dialysepflichtigkeit</b>	3,3 ± 0,8	46,1 [12,9-120,9]
N	111	109
	$P_1 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
<b>Dialysepflichtigkeit</b>	5,1 ± 1,5	313,6 [127,8-925,7]
N	39	38
<b>Gesamtkollektiv</b>	3,8 ± 1,3	82,4 [17,5-268,5]
N	150	147

Tab. 5: Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Median mit Interquartilsrange bei Patienten mit bzw. ohne im Beobachtungszeitraum eingetretener Dialysepflichtigkeit. N = Anzahl (2 Fälle wurden ausgeschlossen). Die unterschiedlichen N im Gesamtkollektiv (150 bzw. 147) sind durch fehlende FGF-23-Messwerte bedingt.  $P_1$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Student-T-Test.  $P_2$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Mann-Whitney-U-Test.

Ebenso zeigt die Einteilung des Studienkollektives in FGF-23-Tertile im Log-Rank-Test ( $p < 0,001$ ) ein signifikant häufigeres Risiko der Dialysepflichtigkeit bei Patienten mit höheren FGF-23-Spiegeln (vgl. Abb. 9).

Auch bei Betrachtung des kombinierten renalen Endpunktes, d.h. Eintreten der Dialysepflichtigkeit im Beobachtungszeitraum oder eine dauerhafte Reduktion der glomerulären Filtrationsrate auf unter 50 % der Werte bei Studienbeginn unterscheiden sich die nach FGF-23 stratifizierten Patienten signifikant (Log-Rank-Test,  $p < 0,001$ ; Abb. 10).

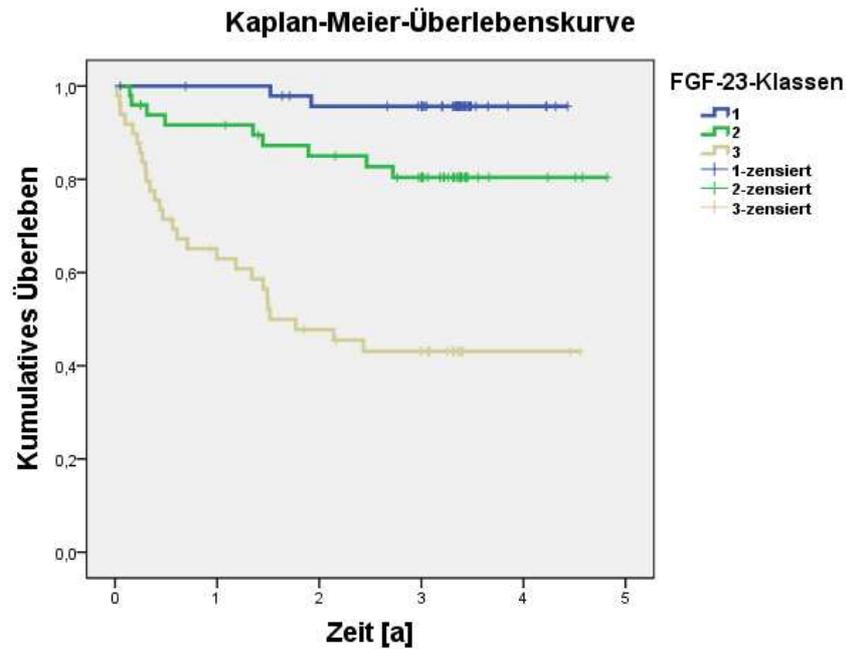


Abb. 9: Kaplan-Meier-Kurve des Erreichens der Dialysepflichtigkeit in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen: FGF-Tertile 1 (n=49): 0-29,9 RU/ml; FGF-Tertile 2 (n=50): 31,6-145,5 RU/ml; FGF-Tertile 3 (n=50): > 147,2 RU/ml.

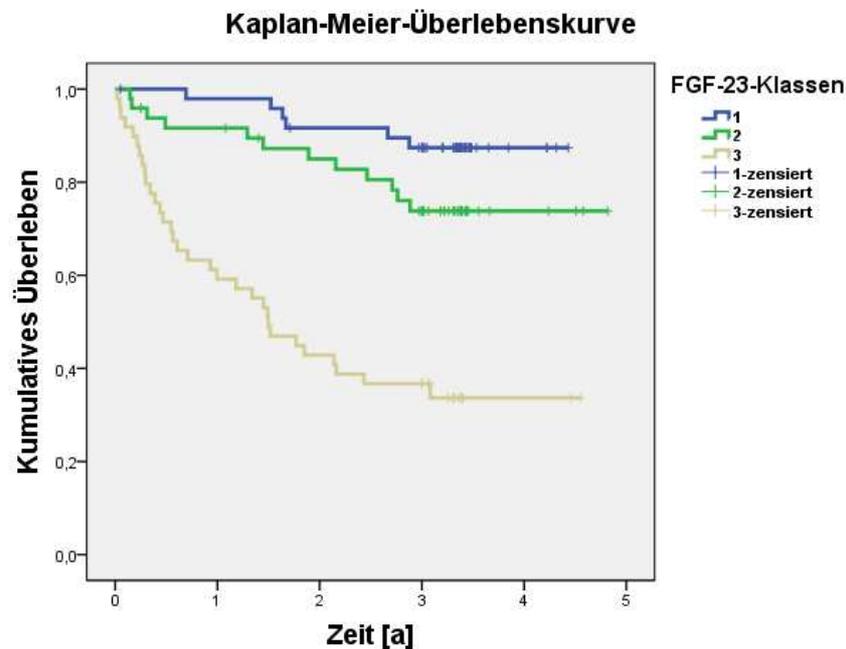


Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve des Eintretens renaler Endpunkte (kombiniert) in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen: FGF-Tertile 1 (n=49): 0-29,9 RU/ml; FGF-Tertile 2 (n=50): 31,6-145,5 RU/ml; FGF-Tertile 3 (n=50): > 147,2 RU/ml.

#### 4.5.2 FGF-23 und kardiovaskuläre Studienendpunkte

Nach einem mittleren Follow-Up von 3 Jahren erlitten von 152 nachbeobachteten Patienten 46 Patienten ein kardiovaskuläres Ereignis. Analog zur Auswertung renaler Endpunkte zeigen sich bei der Betrachtung der Mittelwerte von Serum-Phosphat und Medianen der FGF-23-Werte signifikante Unterschiede ( $p_1$  und  $p_2 < 0,05$ ) im Vergleich der Subgruppe mit bzw. ohne kardiovaskulärem Ereignis (Tab. 6).

	Phosphat [mg/dl]	FGF-23 [RU/ml]
<b>Kein kardiovaskuläres Ereignis</b>	3,6 ± 1,2	61,0 [14,7-159,0]
N	106	103
	$P_1 = 0,023$	$P_2 = 0,016$
<b>Kardiovaskuläres Ereignis</b>	4,2 ± 1,2	134,0 [33,7-386,8]
N	46	46
<b>Gesamtkollektiv</b>	3,8 ± 1,3	81,6 [17,1-267,4]
N	152	149

Tab. 6: Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Median mit Interquartilsrange bei Patienten mit bzw. ohne im Beobachtungszeitraum eingetretenem kardiovaskulärem Ereignis. N = Anzahl. Die unterschiedlichen N im Gesamtkollektiv (152 bzw. 149) sind durch fehlende FGF-23-Messwerte bedingt.  $P_1$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Student-T-Test.  $P_2$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Mann-Whitney-U-Test.

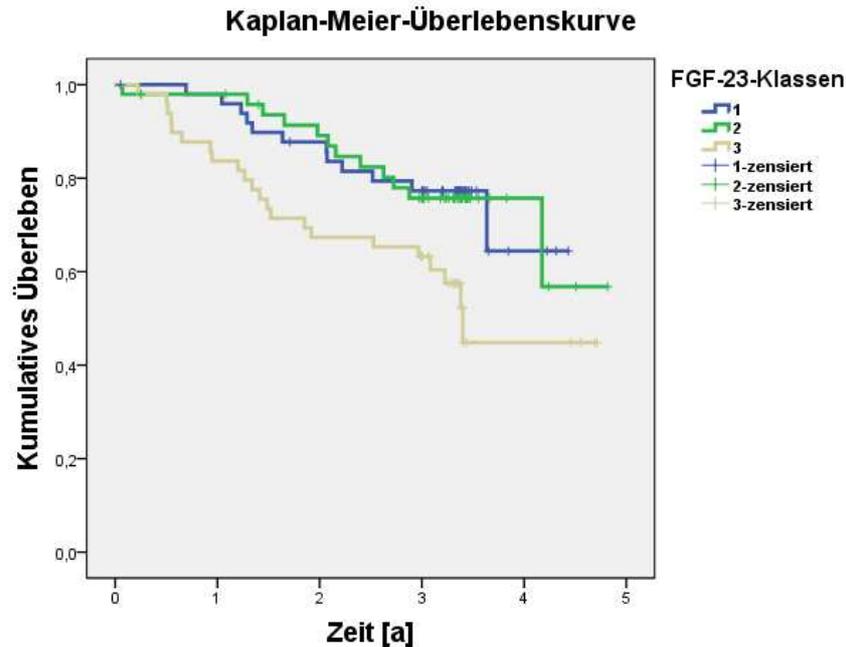


Abb. 11: Kaplan-Meier-Überlebensschätzung für das ereignisfreie Überleben bei in Tertilen nach FGF-23-Spiegeln klassierten Patienten: FGF-Tertile 1 (n=49): 0-29,9 RU/ml; FGF-Tertile 2 (n=50): 31,6-145,5 RU/ml; FGF-Tertile 3 (n=50): > 147,2 RU/ml.

Auch nach Stratifizierung anhand der FGF-23-Tertile zeigen sich Unterschiede im ereignisfreien Überleben in Bezug auf kardiovaskuläre Endpunkte (Log-Rank-Test,  $p = 0,03$ ; Abb. 11).

#### 4.5.3 FGF-23 und Gesamtmortalität

Nach einem mittleren Follow-Up von 3 Jahren sind von 152 nachbeobachteten Patienten 21 Patienten verstorben. Analog zur Auswertung kardiovaskulärer Endpunkte zeigen sich bei der Betrachtung der Mittelwerte von Serum-Phosphat und der Mediane der FGF-23-Werte signifikante Unterschiede im Vergleich der Gruppen (Tab. 7).

	Phosphat [mg/dl]	FGF-23 [RU/ml]
<b>Überlebende Patienten</b> N	3,7 ± 1,2 130	71,0 [15,7-197,7] 127
<b>Verstorbene Patienten</b> N	4,4 ± 1,4 21	263,3 [61,0-1454,0] 21
<b>Gesamtkollektiv</b> N	3,8 ± 1,3 151	81,6 [17,1-267,4] 148

$P_1 = 0,015$                        $P_2 = 0,007$

Tab. 7: Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Median mit Interquartilsrange bei im Beobachtungszeitraum verstorbenen bzw. überlebenden Patienten (Gesamtsterblichkeit). N = Anzahl (1 Fall wurde ausgeschlossen). Die unterschiedlichen N im Gesamtkollektiv (151 bzw. 148) sind durch fehlende FGF-23-Messwerte bedingt.  $P_1$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Student-T-Test.  $P_2$  = zweiseitiges Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen nach Mann-Whitney-U-Test.

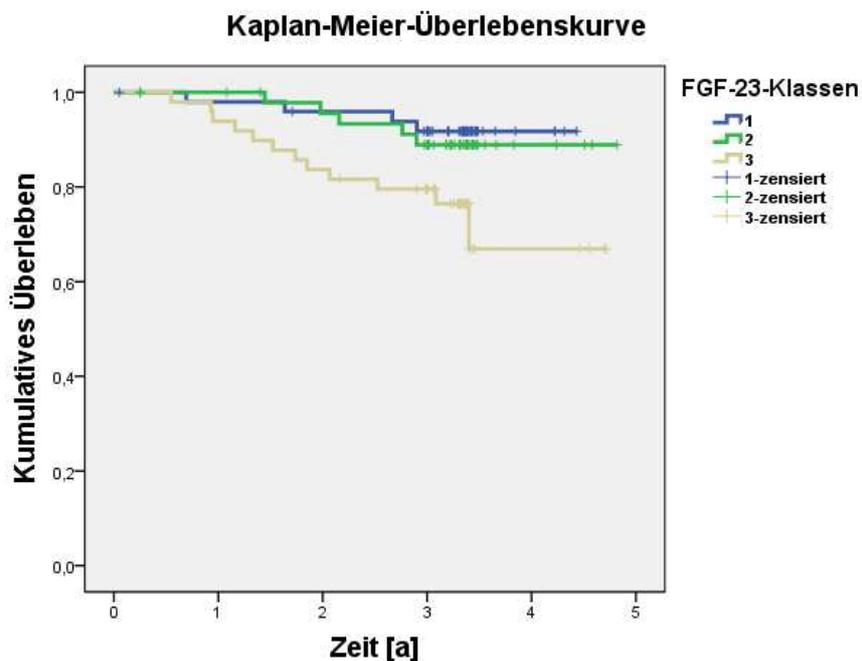


Abb. 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen:  
 FGF-Tertile 1 (n=49): 0-29,9 RU/ml; FGF-Tertile 2 (n=50): 31,6-145,5 RU/ml;  
 FGF-Tertile 3 (n=50): > 147,2 RU/ml.

Auch nach Stratifizierung anhand der FGF-23-Spiegel in Tertile weisen die Patienten mit den höchsten FGF-23-Spiegeln die höchste Mortalität auf (Log-Rank-Test,  $p = 0,034$ ; Abb. 12).

#### 4.5.4 Exkurs

Zwei Jahre nach Abschluss der eigentlichen Follow-Up-Untersuchungen des Verfassers der vorgelegten Dissertationsschrift erfolgte in Zusammenarbeit mit der Betreuerin der Dissertation eine erneute Erhebung von Follow-Up-Daten, so dass der Beobachtungszeitraum auf  $4,8 \pm 0,9$  Jahre verlängert wurde. Für diese finale Auswertung erfolgte in Anlehnung an die MMKD-Studie [54] eine Stratifizierung in zwei Klassen bezüglich der FGF-23-Werte mit einem Cut-Off bei 104 RU/ml.

Tabelle 8 stellt die Basischarakteristika der beiden Patientengruppen dar.

Merkmal	FGF-23 < 104 RU/ml (n=88)	FGF-23 > 104 RU/ml (n=61)	p
Alter [a]	61 ± 13	60 ± 16	0,917
Raucher [%]	9 (10%)	6 (10%)	1,000
Weiblich [%]	39 (44%)	30 (49%)	0,618
Diabetes mellitus [%]	25 (28%)	21 (34%)	0,474
Kardiovask. Vorerkrankung [%]	24 (27%)	21 (34%)	0,369
Body Mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]	30 ± 5	29 ± 6	0,090
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	46 ± 21	22 ± 18	< 0,001
RR systolisch [mmHg]	168 ± 29	170 ± 28	0,564
RR diastolisch [mmHg]	98 ± 19	97 ± 16	0,969
Serum-Calcium [mmol/l]	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,010
Serum-Gesamtcholesterin [mg/dl]	206 ± 47	205 ± 49	0,853
Serum-Phosphat [mg/dl]	3,4 ± 0,8	4,4 ± 1,4	< 0,001
Proteinurie [g/g Kreatinin]	0,8 ± 1,7	2,6 ± 2,9	< 0,001

Tab. 8: Charakteristika des Studienkollektives: Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. Anzahl (prozentualer Anteil) für die Gruppen FGF-23 < oder > 104 RU/ml. N = Anzahl. p = Signifikanzniveau für einen nicht zufälligen Unterschied zwischen beiden Gruppen (Mann-Whitney-Test bei kontinuierlichen Variablen, Fisher's exact-Test bei kategoriablen Variablen).

Es zeigt sich ein längeres ereignisfreies Überleben der Gruppe mit FGF-23-Werten kleiner 104 RU/ml (Log-Rank-Test,  $p = 0,012$ ; Abb. 13).

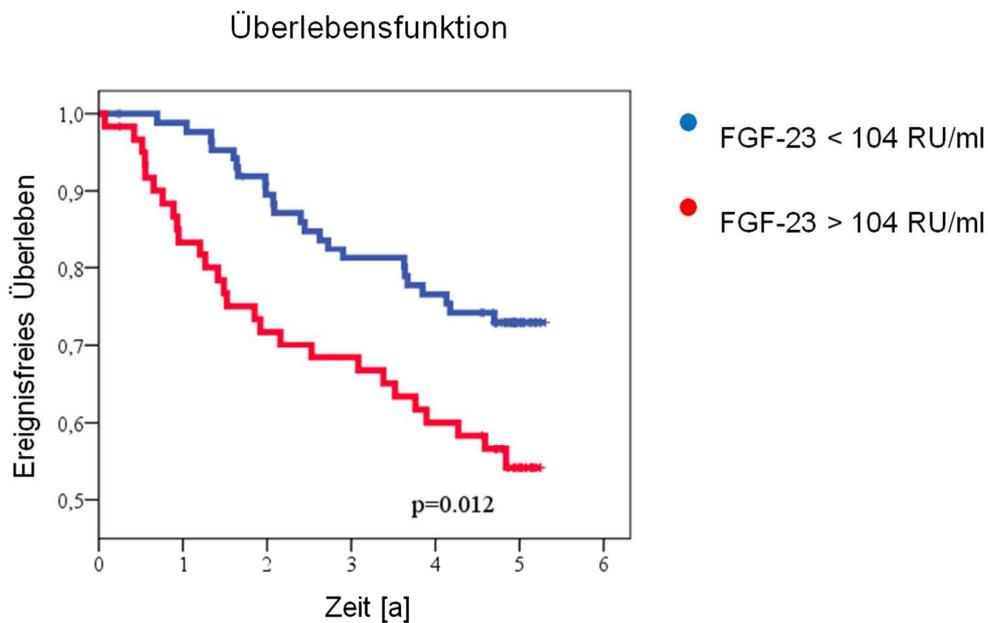


Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurve des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von zwei FGF-23-Klassen (Cut-Off-Wert 104 RU/ml).

Unter Zuhilfenahme des Cox-Regressionsmodells kann für die Gruppe der Patienten mit FGF-23-Werten  $> 104$  RU/ml gezeigt werden, dass sie signifikant häufiger kardiovaskuläre Endpunkte im Beobachtungszeitraum erreicht als die Vergleichsgruppe mit FGF-23-Werten  $< 104$  RU/ml. Dieser Unterschied bleibt auch nach Adjustierung auf Alter und Geschlecht im zweiten Schritt der Analyse, sowie nach Adjustierung auf Diabetes mellitus, vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankung, glomeruläre Filtrationsrate und Serum-Phosphat-Spiegel im dritten Schritt bestehen (Tab. 9).

Die schrittweise berechnete Hazard-Ratio wurde mit den jeweilig zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen angegeben.

Vergleich der Subgruppen mit FGF-23 > 104 RU/ml vs FGF-23 < 104 RU/ml in Bezug auf kardiovaskuläre Endpunkte	Hazard-Ratio	95 % - Konfidenzintervall	p
Schritt 1 (univariat)	2,01	1,15-3,51	0,014
Schritt 2 (multivariat) Adjustierung unter Einschluss von Alter und Geschlecht	2,49	1,41-4,40	0,002
Schritt 3 (multivariat) Einschluss von Diabetes mellitus, kardiovaskulärer Vorerkrankung, eGFR, Serum-Phosphat	2,49	1,40-4,39	0,002

*Tab. 9: Vergleich der Subgruppen mit FGF-23 > 104 RU/ml vs FGF-23 < 104 RU/ml in Bezug auf kardiovaskuläre Endpunkte in einer dreischrittigen multivariaten Analyse*

So zeigt sich die Unabhängigkeit der FGF-23-Spiegel von anderen Risikofaktoren für die Prognose kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität beim untersuchten Studienkollektiv.

## **5 Diskussion**

In der vorgelegten Dissertationsschrift wird bei nierenkranken, nicht-dialysepflichtigen Patienten erstmals aufgezeigt, dass erhöhte FGF-23-Spiegel unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse sind.

### **5.1 Kardiorenale Komorbidität**

Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen kardialer und renaler Morbidität finden in der klinischen Medizin ihren Niederschlag in einem aktuellen Klassifikationsversuch sogenannter kardiorener Syndrome [49].

In einer Bevölkerung mit immer höher liegender durchschnittlicher Lebenserwartung steigen die Inzidenz und die Prävalenz sowohl kardialer als auch renaler Funktionsstörungen.

Auf pathophysiologischer Ebene werden die kardioreneren Wechselwirkungen multifaktoriell vermittelt. Neben hämodynamischen Faktoren (renal induzierte arterielle Hypertonie, intravasale Volumenexpansion durch Natrium- und Wasserretention) spielen ebenfalls endokrin und neural vermittelte Wechselwirkungen (sympathische Stimulation, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, renale Anämie), hormonelle Faktoren (BNP), immunvermittelte Schädigungen (Aktivierung von Monozyten und Zytokin-Sekretion) sowie pharmakologische Beeinflussungen (Therapie mit Diuretika, ACE-Hemmer) eine Rolle.

### **5.2 Konsistenz zu vorausgehenden Studien**

Wir konnten zeigen, dass allgemein anerkannte Zusammenhänge wie die Abhängigkeit der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität vom Stadium der chronischen Niereninsuffizienz im untersuchten Studienkollektiv konsistent zu den Resultaten vorausgehender Studien darstellbar sind [1].

Diese Beobachtung der erhöhten Gesamtsterblichkeit bei fortgeschrittener chronischer Nierenkrankheit im untersuchten Studienkollektiv weist daher auf die Qualität und Validität der erhobenen Daten hin.

### **5.3 Konventionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Patienten mit höheren FGF-23-Spiegeln unterscheiden sich von Patienten mit niedrigeren FGF-23-Spiegeln signifikant in Bezug auf glomeruläre Filtrationsrate, Proteinurie, Calcium- und Phosphat-Spiegel, nicht jedoch hinsichtlich konventioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, kardiovaskulärer Vorgeschichte, Übergewicht, Hypercholesterinämie oder systemarterieller Hypertonie. Daher stellt der FGF-23-Spiegel - beim signifikant unterschiedlichen ereignisfreien Überleben des nach FGF-23-Spiegeln in 2 Klassen stratifizierten Studienkollektivs - einen möglicherweise noch stärkeren kardiovaskulären Risikofaktor als die konventionellen Risikofaktoren bei chronisch nierenkranken Patienten dar.

Denn die Größe des untersuchten Studienkollektivs (N~150) reicht nicht aus, um eine Unterschiedlichkeit hinsichtlich konventioneller Risikofaktoren bei Patienten mit höheren und niedrigeren FGF-23-Spiegeln zu erfassen, weil bei einem Studienkollektiv mit einer Größe um 150 Patienten statistisch nur Unterschiede, die größer als 20-25% bzgl. einer Merkmalsausprägung sind, beim Vergleich zweier Gruppen erfasst werden können [50]. Dies trifft für Rauchen, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Vorgeschichte, Übergewicht, Hypercholesterinämie oder systemarterielle Hypertonie nicht zu.

### **5.4 Erhöhte FGF-23-Spiegel bei chronisch nierenkranken Patienten – Ausdruck verminderter renaler Elimination oder erhöhter Sekretion?**

Bei chronisch nierenkranken Patienten lässt sich eine positive Korrelation zwischen steigenden FGF-23-Spiegeln und abnehmender Nierenfunktion aufzeigen. Obwohl dieser Zusammenhang bei fortgeschrittener Nierenerkrankung am deutlichsten ist, kann er schon in sehr frühen Stadien nachgewiesen werden: selbst bei klinisch gesund wirkenden älteren Patienten mit einer Cystatin-C-basiert errechneten eGFR > 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> [51] konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen FGF-23-Spiegel und der glomerulären Filtrationsrate gefunden werden [11]. Entsprechend zeigte sich auch in einer Studie von Isakova et al. [31] bei chronisch nierenkranken Patienten, dass eine Erhöhung der FGF-23-Spiegel schon bei sehr leicht

eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate nachweisbar ist, während die Serum-Phosphat- und Parathormon-Spiegel in diesem Stadium noch normal sind.

Schließlich hat auch die Heart and Soul Studie die Assoziation einer leicht- bis moderat reduzierten glomerulären Filtrationsrate mit höheren FGF-23-Spiegeln bei Patienten mit kardiovaskulärer Grundkrankheit aufgezeigt [52].

Bei terminaler Niereninsuffizienz (K/DOQI 5) können die FGF-23-Spiegel im Vergleich zu Gesunden bis zu 100-fach erhöht sein [37].

Die Annahme früherer Studien, dass die erhöhten FGF-23-Spiegel bei chronisch nierenkranken Patienten hauptsächlich auf die verminderte renale Clearance zurückzuführen seien, lässt sich dadurch widerlegen, dass das Verhältnis von intaktem und C-terminalen FGF-23 auch bei fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankung stabil bleibt [54].

Die fehlende Akkumulation der c-terminalen FGF-23-Fragmente spricht dabei gegen eine FGF-23-Erhöhung aufgrund verminderter Elimination. Vielmehr gilt inzwischen als Konsens, dass die erhöhten FGF-23-Spiegel direkt auf eine erhöhte FGF-23-Sekretion zurückgeführt werden können [53].

Aktuell gibt es zwei konkurrierende Nachweismethoden für FGF-23 mittels ELISA, die sich darin unterscheiden, welche Bindungsstellen am FGF-23-Molekül die beiden zum Nachweis erforderlichen Antikörper nutzen. Das eine Test-Kit weist lediglich intaktes FGF-23 nach, da jeweils ein Antikörper am C-terminalen und einer am N-terminalen Ende des FGF-23-Moleküls binden muss. Das andere Test-Kit verwendet Antikörper, die beide am C-terminalen Ende des FGF-23-Moleküls inserieren, so dass sowohl intaktes als auch prozessiertes C-terminales FGF-23 nachgewiesen wird (vgl. Abb. 3).

In mehreren Studien bei nierengesunden und nierenkranken Menschen zeigt sich eine enge Korrelation zwischen C-terminalem und N-terminalem FGF-23 [52;54;55].

Weiterhin weist der nahezu identische Verlauf der Kaplan-Meier-Überlebenskurven für renale Endpunkte bei nicht-diabetischen chronisch nierenkranken Patienten nach Stratifizierung entweder für N-terminales FGF-23 (mit einem Cut-Off von 35 pg/ml) oder für C-terminales FGF-23 (mit einem Cut-Off von 104 RU/ml) in der Studie von Fliser et al. [54] darauf hin, dass eine Beschränkung auf die alleinige Bestimmung des C-terminalen FGF-23 statthaft ist.

Selbst die Annahme einer systematischen Überschätzung der wirklichen FGF-23-Spiegel durch die durch obige Studienevidenz als unwahrscheinlich zu bewertende

potentielle zusätzliche Erfassung biologisch inaktiver bereits prozessierter FGF-23-Fragmente hat keine störende Relevanz, da alle gleichartig behandelten und gemessenen Proben demselben systematischen Fehler unterliegen zur statistischen Auswertung in den prospektiven Untersuchungen nicht die absoluten Werte verwendet wurden, sondern die FGF-23-Messwerte relativ zueinander betrachtet wurden, indem FGF-23-Klassen gebildet und analysiert wurden.

## 5.5 FGF-23 als Prognoseparameter

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Inaugurationsschrift weisen weitere Kohortenstudien darauf hin, dass FGF-23 als unabhängiger Risikofaktor für die Prognose der Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz anzusehen ist.

Als erste prospektive Kohortenstudie bei chronisch nierenkranken, nicht-dialysepflichtigen Patienten (unter Ausschluss von Patienten mit diabetischer Nephropathie) untersuchte die MMKD-Studie [54] 227 Patienten im K/DOQI Stadium 1 - 5 im Mittel für 53 Monate hinsichtlich des renalen Endpunktes der Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz. Die MMKD erkannte FGF-23-Spiegel als einen unabhängigen Risikofaktor für die Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz. Als Endpunkte in der MMKD waren - analog der Endpunktdefinition in der durchgeführten Beobachtungsstudie - eine Verdoppelung des Serum-Kreatinins und/oder das Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz mit chronischer Dialysepflichtigkeit definiert.

Ergänzend zeigte eine Cox-Regressionsanalyse der MMKD-Studie, dass der FGF-23-Spiegel nicht nur ein stärkerer Prädiktor als der Serum-Phosphat-Spiegel war, sondern darüber hinaus die Serum-Phosphat-Spiegel nach Adjustierung auf die FGF-23-Spiegel ihren prädiktiven Wert in Bezug auf die Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz gar komplett einbüßten.

Bei inzidenten Dialysepatienten konnte erstmals in der ArMORR-Studie ein - erneut vom Phosphat-Spiegel unabhängiger - Zusammenhang zwischen FGF-23 und der 1-Jahres-Sterblichkeit aufgezeigt werden [55]. Durch eine Einteilung der Probanden in FGF-23-Quartile konnte dargelegt werden, dass die Patienten in der Quartile mit den höchsten FGF-23-Werten eine fast sechsfach so hohe 1-Jahres-Gesamtmortalität aufwiesen wie Patienten in der niedrigsten Quartile, womit sich FGF-23 gegenüber den Phosphat-Spiegeln als deutlich überlegender Risikofaktor der 1-Jahres-Mortalität erwies.

Die vorgelegte Beobachtungsstudie sollte diese vorherigen Arbeiten ergänzen, indem erstmals bei chronischen nierenkranken, jedoch nicht-dialysepflichtigen Menschen eine Assoziation von FGF-23 und kardiovaskulären Ereignissen untersucht wurde.

In der MMKD-Studie wurde das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen nicht berichtet; da die Probanden der MMKD-Studie deutlich jünger waren, eine geringere Komorbidität aufwiesen, welche insbesondere aus dem Ausschluss von Patienten mit diabetischer Nephropathie resultierte, erscheint die MMKD-Studie für die Analyse der kardiovaskulären Prognose chronisch nierenkranker Menschen weniger geeignet als das in dieser Inaugurationsschrift untersuchte Patientengut.

Die aufgezeigte Assoziation einer erhöhten kardiovaskulären Ereignisrate bei Patienten mit erhöhtem FGF-23 könnte entweder aus der Reflexion einer erhöhten Phosphatbelastung resultieren, welche ihrerseits kausal die Progredienz kardiovaskulärer Erkrankungen bedingt [56], oder einen eigenständigen kardiovaskulär schädigenden Effekt von FGF-23 spiegeln. Für letzteres spricht, dass höhere FGF-23-Werte auch nach Adjustierung auf die Phosphat-Spiegel am untersuchten Studienkollektiv einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellen.

Eine wichtige klinische Evidenz für eine extrarenale Organschädigung bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung erkannten Gutiérrez et al. [57], welche eine von anderen Risikoparametern unabhängige Assoziation von hohen FGF-23-Spiegeln und linksventrikulärer Hypertrophie aufgezeigt haben.

Auch die aktuelle HOM SWEET HOME Studie [58] zeigt eine Assoziation zwischen hohen FGF-23-Spiegeln und linksventrikulärer Dysfunktion auch unabhängig vom Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung auf. Gegen eine direkte kardiotoxische Wirkung von FGF-23 wurde eingewendet, dass FGF-23 membranständiges Klotho als Co-Faktor benötigt, Kardiomyozyten jedoch kein Klotho exprimieren. Allerdings konnte jüngst ein Klotho-unabhängiger Effekt von FGF-23 auf Kardiomyozyten experimentell aufgezeigt werden [59].

In der Gesamtschau dieser klinischen und experimentellen Vorarbeiten und der vorgelegten Inaugurationsschrift erscheint die Assoziation zwischen FGF-23 und prävalenten bzw. inzidenten kardiovaskulären Erkrankungen pathophysiologisch nicht alleine aus einer Reflexion der Hyperphosphatämie zu resultieren, sondern FGF-23 eine hiervon unabhängige pathophysiologische Relevanz zu besitzen.

Im Einklang damit hat sich in einer Subgruppen-Analyse des ArMORR-Studienkollektives gezeigt, dass inzidente Dialysepatienten bei Einnahme von Phosphatbindern ein besseres Überleben aufwiesen, welches erstaunlicherweise nach Adjustierung für die Phosphat-Spiegel persistierte [60]. Da die Einnahme von Phosphatbindern nicht allein das Serum-Phosphat, sondern aufgrund der dargestellten endokrinologischen Regulationsmechanismen auch FGF-23 senkt, erscheint denkbar, dass der phosphatunabhängige Effekt der Einnahme oraler Phosphatbinder aus der Senkung von FGF-23 resultierte.

Auch die Persistenz der Assoziation zwischen erhöhtem FGF-23 und kardiovaskulärem Risiko in der untersuchten Studienkohorte nach Korrektur für Serum-Phosphat-Spiegel weist auf eine eigenständige Schädigung durch hohe FGF-23-Spiegel hin.

## **5.6 FGF-23 und kardiovaskuläre Risikoprognoseinstrumente**

In der nierengesunden Allgemeinbevölkerung wurden mehrere Risikoscore-Systeme zur Vorhersage der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität entwickelt (ATP III-Risikokalkulator (Adult Treatment Panel), ESC Euro Score, PROCAM Score [61]). Eine erste Limitation ist in der heterogenen Zusammensetzung der zu Grunde liegenden Studienkollektive zu sehen. Weitere Beschränkungen liegen in einer mangelhaften externen Kalibrierung, d.h. einer mangelnden Adjustierung vorhergesagter auf tatsächlich stattgefundenere Ereignisse, in einer begrenzten Diskrimination, d.h. die korrekte Zuordnung eines Patienten mit entsprechendem Risiko in die richtige Risikoklasse, in statistischen Limitationen und schlussendlich auch in der Anwendbarkeit der Risikoprognoseparameter auf eine andere als die der Erhebung zu Grunde liegende Population, die sich etwa in Lebensgewohnheiten und geographischer Varianz von der zu Grunde liegenden Studienpopulation erheblich unterscheiden kann.

Bei der Beurteilung der Übertragbarkeit der Risikoprognoseinstrumente ist außerdem zu beachten, dass auf der Grundlage der vor vielen Jahre rekrutierten Daten die Vorhersagbarkeit der aktuellen Lebenswirklichkeit eingeschränkt sein kann [62].

Auch die Potenz der Diskrimination, das heißt die korrekte Klassifizierung von Personen mit unterschiedlichem Risiko, ist in den meisten Studien nur als ausreichend, keineswegs als gut zu beurteilen. Die Diskriminationsfähigkeit der unterschiedlichen Risikoprognoseinstrumente liegt bei allen Scoresystemen in einem Bereich, in dem eine Falschzuordnung der Patienten in ca. 10 – 25 % der Fälle möglich ist [61]. Dies

kann einerseits zu Risikoüberschätzung und zur potentiellen Überbehandlung führen, andererseits kann eine Risikounterschätzung eine potentiell therapeutisch sinnvolle Intervention verhindern [63].

All die vielfältigen Risikoscore-Systeme zur Risikoreduktion kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität sind aktuell für die deutsche Population nicht ausreichend validiert und daher nur eingeschränkt einsetzbar.

Interessanterweise haben sich zum aktuellen Zeitpunkt Risikoprognosesysteme zum Abschätzen der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität, die neben den oben aufgeführten Risikofaktoren auch die Ausprägung einer chronischen Niereninsuffizienz berücksichtigen, nicht in der klinisch breiten Verwendung etablieren können, obwohl eine vielfältige Studienevidenz die chronische Niereninsuffizienz als unabhängigen Risikofaktor kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität sicher aufgezeigt hat [64].

Ebenfalls muss angemerkt werden, dass aktuell keine Studien zum Einsatz von Risikoprognoseinstrumenten in der Primärprävention bei unselektiertem Patientengut vorliegen, die einen Rückgang von Mortalität oder Morbidität durch den Einsatz entsprechender Score-Systeme mit konsekutiver Zuführung in eine adaptierte Therapie nachweisen. Gleichwohl darf diese Tatsache nicht mit dem evidenten Nachweis der Reduktion klinischer Ereignisse durch Beeinflussung eines einzelnen Risikofaktors verwechselt werden.

Auf der Basis der vorliegenden Arbeit kann postuliert werden, dass FGF-23 neben der glomerulären Filtrationsrate einen sinnvollen Parameter für zukünftige Prognose-scores darstellen könnte, welche neben klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren auch die chronische Nierenerkrankung als nicht-klassischen Risikofaktor berücksichtigen. Ein solcher Risikoscore muss durch weiterführende größere Studien etabliert und verifiziert werden.

## **5.7 Therapeutische Relevanz einer gezielten Beeinflussung der FGF-23-Spiegel**

Aktuell befinden sich keine Medikamente, die bei chronisch nierenkranken Patienten erhöhte FGF-23-Spiegel direkt therapeutisch beeinflussen können, vor der Marktreife. Allerdings können hohe FGF-23-Spiegel indirekt über den Einsatz von Phosphatbindern gesenkt werden, wie Ergebnisse von Tierstudien [65] und vorläufige Daten aus Studien an Menschen [66;67] aufzeigen.

Im Einklang mit einer prognostisch relevanten Beeinflussung erhöhter FGF-23-Spiegel legen Daten klinischer Kohortenstudien nahe, dass eine Therapie mit Phosphatbindern einen prognostischen Benefit hat, der nicht allein aus der Reduktion der Phosphat-Spiegel resultiert. So könnte postuliert werden, dass die positiven Effekte von Phosphatbindern auf die Prognose der Patienten in der ArMORR Studie zumindest partiell über eine Senkung der FGF-23-Werte zustande gekommen sind. Hierfür spricht der von den Phosphat-Werten vor und unter Phosphatbindereinnahme unabhängige Effekt von Phosphatbindern auf die Mortalität.

Klinische Studien, die den Effekt einer Phosphatbindermedikation einerseits auf FGF-23, andererseits auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse untersuchen, laufen aktuell. So wird eine Phase III-Interventionsstudie der Penn State Universität USA im Juni 2012 abgeschlossen sein, die bei Patienten im Alter von 18-80 Jahren mit einer eGFR  $< 50$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> die Gabe des Phosphatbinders Sevelamercarbonat 800 mg dreimal täglich zu den Mahlzeiten über 3 Monate gegenüber einer Placebo-Applikation hinsichtlich der Senkung der FGF-23-Spiegel untersucht.

Eine weitere französische multizentrische Phase III-Interventionsstudie der Universität Amien mit ähnlichem Studiendesign bei über 18 Jahre alten Patienten mit einer eGFR zwischen 15 und 45 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> und einem C-terminalem FGF-23-Spiegel  $> 120$  RU/ml, was mit der Stratifizierung in FGF-23-Klassen mit einem Cut-Off von 104 RU/ml in der vorgelegten Studie vergleichbar ist, untersucht gleichfalls die Effekte des Phosphatbinders Sevelamercarbonat auf die Höhe der FGF-23-Spiegel. Diese Studie wird ebenfalls voraussichtlich 2012 abgeschlossen sein.

Darüber hinausgehend zeigt die SHARP-Studie (Study of Heart und Renal Protection), dass die Langzeitbehandlung mit einer Kombination aus Ezetimib und Simvastatin das kardiovaskuläre Risiko signifikant bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten, unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung, vermindert [68;69].

## 5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Untersuchung zeigt als erste Studie dieser Art, dass erhöhte FGF-23-Werte bei chronisch nierenkranken Patienten, die nicht dialysepflichtig sind, unabhängig mit dem Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert sind. Diese Resultate ergänzen die analogen Ergebnisse ähnlicher Studien bei dialysepflichtigen Patienten.

In Anbetracht der Größe des untersuchten Studienkollektiv und den damit verbundenen statistischen Limitationen sollten weitere große multizentrische Studien bei chronisch nierenkranken Patienten erfolgen, um die hier dargelegte Evidenz erhöhter FGF-23-Spiegel als prognostisches Instrument zur Risikostratifizierung kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität zu festigen.

Möglicherweise erlaubt das verbesserte Verständnis des sekundären Hyperparathyreoidismus, nach welchem zumindest in früheren Stadien der chronischen Nierenerkrankung erhöhte FGF-23-Spiegel und Parathormonspiegel sowie niedrigere Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel zur Erhaltung der Normophosphatämie in Kauf genommen werden [70], neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen.

Eine direkte pharmakologische Beeinflussung erhöhter FGF-23-Spiegel oder eine indirekte FGF-23-Senkung durch frühen Einsatz von Phosphatbindern könnten somit vielversprechende zukünftige Therapieoptionen bei Patienten mit frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung darstellen [71;72], die aufgrund ihrer Normophosphatämie nach aktuellen Leitlinien keine Indikation zur Einnahme von Phosphatbindern aufweisen.

Diese Maßnahmen könnten die konventionelle kardio- und nephroprotektive Medikation, welche die Einnahme von Statinen und ACE-Hemmern umfasst, sinnvoll ergänzen und zur weiteren kardiovaskulären Prognoseverbesserung bei der großen, gesundheitsökonomisch relevanten Gruppe chronisch nierenkranker Patienten führen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Giachelli CM: The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int*, 2009
- 2 Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL: Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 71:31-38, 2007
- 3 Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM, Port FK: Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 52:519-530, 2008
- 4 Wald R, Sarnak MJ, Tighiouart H, Cheung AK, Levey AS, Eknoyan G, Miskulin DC: Disordered mineral metabolism in hemodialysis patients: an analysis of cumulative effects in the Hemodialysis (HEMO) Study. *Am J Kidney Dis* 52:531-540, 2008
- 5 Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP: Statins and cardiovascular events in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. The AURORA results suggest the need for earlier intervention. *Curr Vasc Pharmacol* 7(3):264-6, 2009
- 6 Zannad F, Kessler M, Lehert P, Grunfeld JP, Thuilliez C, Leizorovics A, Lechat P: Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int* 70:1318-1324, 2006
- 7 Wanner C, Krane V, Marz W, Olschewski M, Mann JF, Ruf G, Ritz E: Atorvastatin in patients with type2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 353:238-248, 2005

- 8 Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA: The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Eng J Med* 339:584-590, 1998
- 9 Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, Daugirdas JT, Greene T, Kusek JW, Allon M, Bailey J, Delmez JA, Depner TA, Dwyer JT, Levey AS, Levin NW, Milford E, Ornt DB, Rocco MV, Schulman G, Schwab SJ, Teehan BP, Toto R: Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 347:2010-2019, 2002
- 10 Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N: Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277:494-498, 2000
- 11 Seiler S, Heine GH, Fliser D: Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 114:S34-42, 2009
- 12 Kenneth EW, Evans WE, O'Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Meitinger T, Strom TM: Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 26:345-348, 2000
- 13 Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD: Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E38-49, 2006
- 14 White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ: Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int* 60:2079-2086, 2001
- 15 Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ, Yu X, White KE, Inagaki T, Kliwer SA, Yamamoto M, Kurosu H, Ogawa Y, Kuro-o M, Lanske B, Razzaque MS, Mohammadi M: Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol* 27:3417-3428, 2007

- 16 Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB: FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115:1627-35, 2005
- 17 Yamashita T: Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9:313-318, 2005
- 18 Benet-Pages A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, White KE, Econs MJ, Strom TM: FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX. *Bone* 35:455-462, 2004
- 19 Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143:3179-3182, 2002
- 20 Khosravi A, Cutler CM, Kelly MH, Chang R, Royal RE, Sherry RM, Wodajo FM, Fedarko NS, Collins MT: Determination of the elimination half-life of fibroblast growth factor-23. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2374-2377, 2007
- 21 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohshima Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45-51, 1997
- 22 Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y: *Klotho* is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 279:9777-9784, 2004
- 23 Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J: Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149, 2005
- 24 Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA: Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137, 2005
- 25 Ornitz DM, Itoh N: Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3)reviews3005, 2001

- 26 Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, Densmore MJ, Taguchi T, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Razzaque MS: In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23)-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J* 23:433-441, 2009
- 27 Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St Arnaud R, Lanske B: Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J* 20:720-722, 2006
- 28 Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M: Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 281:6120-6123, 2006
- 29 Moranne O, Froissart M, Rossert J, Gauci C, Boffa JJ, Haymann JP, M'rad MB, Jacquot C, Houillier P, Stengel B, Fouqueray B: Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Am Soc Nephrol* 20:164-171, 2009
- 30 Jones G: Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1-alpha-hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial* 20:316-324, 2007
- 31 Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CA, Lash JP, Hsu CY, Leonard MB, Wolf M: Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 79:1370-8, 2011
- 32 Nakai K, Komaba H, Fukagawa M: New insights into the role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *J Nephrol* 23(06):619-625, 2010
- 33 Miyamoto K, Segawa H, Ito M, Kuwahata M: Physiological regulation of renal sodium-dependent phosphate cotransporters. *Jpn J Physiol* 54:93-102, 2004
- 34 Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K: Differential effects of Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1271-1278, 2003

- 35 Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, Quigley R: Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney Int* 68:1148-1153, 2005
- 36 Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H: Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9:331-335, 2005
- 37 Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Jüppner H, Jonsson KB: Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int* 64:2272-9, 2003
- 38 Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561-8, 2004
- 39 Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE: Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 195:125-131, 2007
- 40 Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19:429-435, 2004
- 41 Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD: Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol* 18:2116-24, 2007
- 42 Reichart B: Intrarenale Widerstandsindices : reflektieren sie eine generalisierte Atherosklerose oder spiegeln sie lokale renale vaskuläre Veränderungen wider? <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2011/4477/>, 2011
- 43 Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ, MDRD Study Group: Simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 11:A0828, 2000
- 44 Josephy PD, Eling T, Mason RP: The horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. *J of Biol Chem* 257:3669-3675, 1982

- 45 Seyer B: Enzymkinetik: das Michaelis-Menten-Gesetz an ausgewählten Beispielen, Fachbereichsarbeit, Albert Magnus Gymnasium, 2009
- 46 Heijboer AC, Levitus M, Vervloet MG, Lips P, ter Wee PM, Dijkstra HM, Blankenstein MA: Determination of fibroblast growth factor 23. *Ann Clin Biochem* 46(Pt 4):338-40, 2009
- 47 Schulze PM: Beschreibende Statistik, 6. Auflage, Oldenbourg Verlag, 2007
- 48 Sylvester R: Phase I, II and III trials: role, description and statistical design. in Rotmensz (Ed.), *Data management and clinical trials*. 9-35, Elsevier, 1989
- 49 Galle J: Das kardioresnale Syndrom, *Med Klinik* 105:1429ff, 2010
- 50 Beck-Bornholdt HP, Dubben HH: Der Hund der Eier legt, Erkennen von Fehlinformationen durch Querdenken, 7. Auflage, Rowohlt Taschenbuch Verlag, 2005
- 51 Larsson A, Malm J, Grubb A, Hansson LO: Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. *Scand J Clin Lab Invest* 64:25-30, 2004
- 52 Ix JH, Shlipak MG, Wassel CL, Whooley MA: Fibroblast growth factor-23 and early decrements in kidney function: the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 25(3):993-7, 2010.
- 53 Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, Miura M, Miyauchi A, Kobayashi K, Miki T, Shoji T, Ishimura E, Nishizawa Y: FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int* 65:1943-1946, 2004
- 54 Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F, Kuen E, König P, Kraatz G, Mann JF, Müller GA, Köhler H, Riegler P: Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 18:2600-2608, 2007
- 55 Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M: Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 359:584-592, 2008

- 56 Ellam TJ, Chico TJ: Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis* 220(2):310-8, 2012
- 57 Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M: Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* 119:2545-52, 2009
- 58 Seiler S, Cremers B, Rebling NM, Hornof F, Jeken J, Kersting S, Steimle C, Ege P, Fehrenz M, Rogacev KS, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH: The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 32(21):2688-96, 2011
- 59 Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tie-mann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro-O M, Kusek JW, Keane MG, Wolf M: FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 121(11):4393-408, 2011
- 60 Isakova T, Gutierrez OM, Chang Y, Shah A, Tamez H, Smith K, Thadhani R, Wolf M: Phosphorus binders and survival on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 20:388-396, 2009
- 61 Gorenoi V, Schönermark MP, Hagen A: Instrumente zur Risikoprädiktion für kardiovaskuläre Erkrankungen, Health Technology Assessment (HTA Bd. 90), Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) Köln, 2009
- 62 Justice AC, Covinsky KE, Berlin JA: Assessing the generalizability of prognostic information. *Ann Intern Med* 130(6):515-524, 1999
- 63 Lenz M, Mühlhauser I: Cardiovascular risk assessment for informed decision making. Validity of prediction tools. *Med Klinik* 99(11): 651-661, 2004
- 64 Sarnak MJ, Coronado BE, Greene T, Wang SR, Kusek JW, Beck GJ, Levey AS: Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 57(5):327-35, 2002

- 65 Nagano N, Miyata S, Abe M, Kobayashi N, Wakita S, Yamashita T, Wada M: Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. *Kidney Int* 69:531-537, 2006
- 66 Koiwa F, Kazama JJ, Tokumoto A, Onoda N, Kato H, Okada T, Nii-Kono T, Fukagawa M, Shigematsu T: Sevelamer hydrochloride and calcium bicarbonate reduce serum fibroblast growth factor 23 levels in dialysis patients. *Ther Apher Dial* 9:336-339, 2005
- 67 Pande S, Ritter CS, Rothstein M, Wiesen K, Vassiliadis J, Kumar R, Schiavi SC, Slatapolsky E, Brown AJ: FGF-23 and sFRP-4 in chronic kidney disease and post-renal transplantation. *Nephron Physiol* 104:23-32, 2006
- 68 SHARP Collaborative Group: Study of heart and renal protection (SHARP): randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease. *Am Heart J* 160:785-794.e10, 2010
- 69 Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, Wanner C, Krane V, Cass A, Craig J, Neal B, Jiang L, Hooi LS, Levin A, Agodoa L, Gaziano M, Kasiske B, Walker R, Massy ZA, Feldt-Rasmussen B, Krairitichai U, Ophascharoensuk V, Fellström B, Holdaas H, Tesar V, Wiecek A, Grobbee D, de Zeeuw D, Grönhagen-Riska C, Dasgupta T, Lewis D, Herrington W, Mafham M, Majoni W, Wallendszus K, Grimm R, Pedersen T, Tobert J, Armitage J, Baxter A, Bray C, Chen Y, Chen Z, Hill M, Knott C, Parish S, Simpson D, Sleight P, Young A, Collins R; SHARP Investigators: The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 25;377(9784):2181-92, 2011
- 70 Evenepoel P, Meijers B, Viaene L, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanderschueren D, Vanrenterghem Y: Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol* 5(7):1268-76, 2010

- 71 Cancela AL, Oliveira RB, Graciolli FG, dos Reis LM, Barreto F, Barreto DV, Cupari L, Jorgetti V, Carvalho AB, Canziani ME, Moysés RM: Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. *Nephron Clin Pract* 117(1):c74-82, 2011
- 72 Sigrist MK, Chiarelli G, Lim L, Levin A: Early initiation of phosphate lowering dietary therapy in non-dialysis chronic kidney disease: a critical review. *J Ren Care* 35 Suppl 1:71-78, 2009

## 7 Darstellungsverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Illustration der konventionellen Vorstellung der Genese eines renal bedingten sekundären Hyperparathyreoidismus	S. 16
Abb. 2	Illustration der modifizierten Vorstellung der Genese eines renalen sekundären Hyperparathyreoidismus	S. 17
Abb. 3	Unterschiedliche Nachweismethoden für FGF-23	S. 25
Abb. 4	Illustration der Nachweismethode für FGF-23 mittels Sandwich-ELISA und photometrischer Messung	S. 26
Abb. 5	Abhängigkeit der Intensität des einfallenden monochromatischen Lichtes ( $I_0$ ) und durch die Probe durchtretende Lichtintensität ( $I_1$ )	S. 30
Abb. 6	Verteilung der Grunderkrankungen im Studienkollektiv unter Zusammenfassung wichtiger Klassen	S. 34
Abb. 7	Darstellung der Abhängigkeit von Parathormon-Spiegel und Phosphat-Werten zu dekadisch logarithmierten FGF-23-Werten	S. 36
Abb. 8	Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Gesamtsterblichkeit nach K/DOQI-Stadien	S. 38
Abb. 9	Kaplan-Meier-Kurve des Erreichens der Dialysepflichtigkeit in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen	S. 40
Abb. 10	Kaplan-Meier-Kurve des Eintretens renaler Endpunkte (kombiniert) in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen	S. 40
Abb. 11	Kaplan-Meier-Kurve für das kardiovaskuläre Überleben bei in Tertilen nach FGF-23-Spiegeln klassierten Patienten	S. 42
Abb. 12	Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von FGF-23-Tertilen	S. 43
Abb. 13	Kaplan-Meier-Kurve des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von zwei FGF-23-Klassen (Cut-Off-Wert 104 RU/ml)	S. 45

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Charakteristik des Studienkollektives, prozentuale Verteilung der renalen Grunderkrankungen	S. 33
Tab. 2	Beschreibung der Basischarakteristika des Studienkollektives	S. 35
Tab. 3	Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Korrelationen von Serum-Calcium, Serum-Phosphat, eGFR und Parathormon	S. 36
Tab. 4	Rangkorrelationsanalyse nach Spearman: Korrelationen von Serum-Calcium, Serum-Phosphat, eGFR, Parathormon und Alter mit logarithmierten FGF-23-Werten	S. 37
Tab. 5	Unterschiede bei Patienten mit bzw. ohne im Beobachtungszeitraum eingetretener Dialysepflichtigkeit in Bezug auf Serum-Phosphat und FGF-23	S. 39
Tab. 6	Unterschiede bei Patienten mit bzw. ohne im Beobachtungszeitraum eingetretenem kardiovaskulärem Ereignis in Bezug auf Serum-Phosphat und FGF-23	S. 41
Tab. 7	Unterschiede bei im Beobachtungszeitraum verstorbenen bzw. überlebenden Patienten in Bezug auf Serum-Phosphat und FGF-23	S. 43
Tab. 8	Charakteristika des Studienkollektives bei nach FGF-23-Werten (< oder > 104 RU/ml) stratifizierten Patienten	S. 44
Tab. 9	Vergleich der Subgruppen mit FGF-23 < oder > 104 RU/ml in Bezug auf kardiovaskuläre Endpunkte in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse	S. 46

## 8 Publikationen

Seiler S, Reichart B, Roth D, Seibert E, Fliser D, Heine GH: FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 25(12):3983-9, 2010

Seiler S, Roth D, Reichart B, Fliser D, Heine GH: FGF-23 as a predictor of cardiovascular mortality in non-dialysis CKD patients. Posterpräsentation American Society of Nephrology Jahrestagung 2009

Rogacev K, Seiler S, Zawada A, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH: CD 14<sup>++</sup>16<sup>+</sup> monocytes are independent predictors of cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32(1):84-92, 2011

## 9 Anhang

### 9.1 Datenerhebung Hausarztbefragung

#### UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES

Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Fliser



Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes, D-66421 Homburg

#### Telefax (2 Seiten)

Frau / Herr Dr. med.  
Telefax:

#### Follow-up-Studie bei chronisch nierenkranken Patienten

#### Patient:

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

wir führen bei einem Patientenkollektiv von 150 Patienten eine Follow-up-Studie zur Evaluierung von sonographischen und laborchemischen Progressionsmarkern bei chronischen Nierenerkrankungen durch. Der Beobachtungszeitraum der Studie umfasst die Jahre 2004-2007/2008. Wir haben eine telefonische Befragung der initial 2004 bei uns in einer Studie erfassten Patienten im Jahr 2007/2008 durchgeführt.

Die/der o.g. Patientin/Patient hat telefonisch sein Einverständnis in Bezug auf die Weitergabe der haus- und fachärztlich erfassten Daten an uns zu Studienzwecken erklärt. Weiterhin wurde die Untersuchung durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

Aufgrund einiger fehlender Daten sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen und bitten Sie freundlichst um einige Angaben in Bezug auf Ihre oben genannten Patienten. Insbesondere sind für uns die von Ihnen dokumentierten Kreatinin-Werte im Beobachtungszeitraum wichtig. Wir behandeln selbstverständlich alle Daten anonymisiert.

Bitte faxen Sie uns den Fragebogen, auch wenn Sie nicht zu allen Punkten Angaben machen können, an die Telefax-Nummer 06841-16-zurück. Gerne können Sie uns ein Ausdruck der Laborwerte (insbesondere Kreatinin-Werte im zeitlichen Verlauf) als Anhang zukommen lassen.

Bei Rückfragen erreichen Sie uns unter der Telefonnummer 06841-16-23527 (PD Dr. med. G. Heine / Frau Dr. med. S. Seiler über Sekretariat Frau Kolb).

**Wir danken Ihnen ganz herzlich für Ihre freundliche  
Unterstützung unserer Studie!**

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

PD Dr. med. G. Heine  
Oberarzt der Klinik

Dr. med. S. Seiler  
Assistenzärztin

D. Roth  
Doktorand

**Innere Medizin IV**  
Kirberger Straße  
66421 Homburg/Saar

Prof. Dr. D. Fliser

Sekretariat und Privatambulanz

Tel.: 06841-16-23526

Fax: 06841-16-23540

[prof.dr.danilo.fliser@uniklinikum-saarland.de](mailto:prof.dr.danilo.fliser@uniklinikum-saarland.de)

[www.uniklinik-saarland.de/nephrologie](http://www.uniklinik-saarland.de/nephrologie)

Datum: 14.04.2009

Unser Zeichen: dr

#### Ambulanzen

Nieren- und Hochdruck-Ambulanz  
Tel. 23502 Fax 23508

Transplantations-Ambulanz

Tel. 23510 Fax 23508

Peritonealdialyse-Ambulanz

Tel. 23534 Fax 23508

Risikofaktoren-Sprechstunde

Ernährung

Psychologische Beratung

Tel. 23562 Fax 23545

Diabetische Nephropathie-

Ambulanz

Tel. 23502 Fax 23508

Nierenstein-Ambulanz

Tel. 23502 Fax 23508

#### Funktionsdiagnostik

Duplexsonographie

Ergometrie

Tel. 23502/23509 Fax 23508

#### Stationen

Station M401 (Geb. 40)

Tel. 23522 Fax 23555

Station M402 (Geb.6)

Tel. 23506 Fax 23558

#### Funktionsbereich Hämodialyse

M403 (Geb. 40, Zentrale)

Tel. 23503 Fax 23567

M404 Akutdialyse (Geb. 40)

Tel. 23505 Fax 23567

M405 (Geb.40)

Tel. 23504 Fax 23567

Dialysezstützpunkt (Geb. 6)

Tel. 23561 Fax 23567

#### Aphereseverfahren

Tel. 23505 Fax 23567

#### Nephrologisches Labor

Forschungslabor

Tel. 23512 Fax 23499

Urinlabor

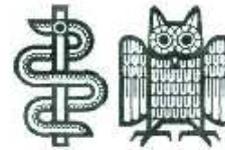
Tel. 23535 Fax 23499

#### Transplantationsbüro

Tel. 23551 Fax 23597

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES

**Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten**  
**Direktor: Prof. Dr. med. D. Fliser**



Innere Medizin IV, Universitätsklinikum des Saarlandes, D-66421 Homburg

Herrn  
Dr. med. Mustermann  
Musterstr. 12

66421 Homburg

### Follow-up-Studie bei chronisch nierenkranken Patienten

#### Patient:

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

wir führen bei einem Patientenkollektiv von 150 Patienten eine Follow-up-Studie zur Evaluierung von sonographischen und laborchemischen Progressionsmarkern bei chronischen Nierenerkrankungen durch. Der Beobachtungszeitraum der Studie umfasst die Jahre 2004-2007/2008. Wir haben eine telefonische Befragung der initial 2004 bei uns in einer Studie erfassten Patienten im Jahr 2007/2008 durchgeführt.

Die/der o.g. Patientin/Patient hat telefonisch sein Einverständnis in Bezug auf die Weitergabe der haus- und fachärztlich erfassten Daten an uns zu Studienzwecken erklärt. Weiterhin wurde unsere Untersuchung durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

Aufgrund einiger fehlender Daten sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen und bitten Sie freundlichst um einige Angaben in Bezug auf Ihre oben genannten Patienten. Insbesondere sind für uns die von Ihnen dokumentierten Kreatinin-Werte im Beobachtungszeitraum wichtig. Wir behandeln selbstverständlich alle Daten anonymisiert.

Bitte senden Sie uns den Fragebogen, auch wenn Sie nicht zu allen Punkten Angaben machen können, per Post mit beiliegendem Antwortumschlag zurück. Gerne können Sie uns ein Ausdruck der Laborwerte (insbesondere Kreatinin-Werte im zeitlichen Verlauf) als Anhang zukommen lassen.

Bei Rückfragen erreichen Sie uns unter der Telefonnummer 06841-16-23527 (PD Dr. med. G. Heine / Frau Dr. med. S. Seiler über Sekretariat Frau Kolb).

**Wir danken Ihnen ganz herzlich für Ihre freundliche  
Unterstützung unserer Studie!**

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

PD Dr. med. G. Heine  
Oberarzt der Klinik

Dr. med. S. Seiler  
Assistenzärztin

D. Roth  
Doktorand

**Innere Medizin IV**  
Kimberger Straße  
66421 Homburg/Saar

**Prof. Dr. D. Fliser**

**Sekretariat und Privatambulanz**

Tel.: 06841-16-23526

Fax: 06841-16-23540

[prof.dr.danilo.fliser@uniklinikum-saarland.de](mailto:prof.dr.danilo.fliser@uniklinikum-saarland.de)

[www.uniklinik-saarland.de/nephrologie](http://www.uniklinik-saarland.de/nephrologie)

Datum: 14.04.2009

Unser Zeichen: dr

#### **Ambulanzen**

Nieren- und Hochdruck-Ambulanz

Tel. 23502 Fax 23508

Transplantations-Ambulanz

Tel. 23510 Fax 23508

Peritonealdialyse-Ambulanz

Tel. 23534 Fax 23508

Risikofaktoren-Sprechstunde

Ernährung

Psychologische Beratung

Tel. 23562 Fax 23545

Diabetische Nephropathie-

Ambulanz

Tel. 23502 Fax 23508

Nierenstein-Ambulanz

Tel. 23502 Fax 23508

#### **Funktionsdiagnostik**

Duplexsonographie

Ergometrie

Tel. 23502/23509 Fax 23508

#### **Stationen**

Station M401 (Geb. 40)

Tel. 23522 Fax 23555

Station M402 (Geb.6)

Tel. 23506 Fax 23558

#### **Funktionsbereich Hämodialyse**

M403 (Geb. 40, Zentrale)

Tel. 23503 Fax 23567

M404 Akutdialyse (Geb. 40)

Tel. 23505 Fax 23567

M405 (Geb.40)

Tel. 23504 Fax 23567

Dialysezülpunkt (Geb. 6)

Tel. 23561 Fax 23567

#### **Aphereseverfahren**

Tel. 23505 Fax 23567

#### **Nephrologisches Labor**

Forschungslabor

Tel. 23512 Fax 23499

Urinlabor

Tel. 23535 Fax 23499

#### **Transplantationsbüro**

Tel. 23551 Fax 23597

**Patient:**

Name	Vorname	Geb.-Datum

Falls Sie eine Frage mit „Ja“ beantworten, bitte wir Sie freundlich um ergänzende Angaben.

- 1 Hatte der Patient seit 2004 einen Myokardinfarkt?  
 ja  nein  
*falls ja:* Diagnose / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 2 Hatte der Patient seit 2004 eine Bypass-Operation?  
 ja  nein  
*falls ja:* Procedur / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 3 Hatte der Patient seit 2004 eine interventionelle Koronarangiographie mit Dilatation oder Stent-Implantation?  
 ja  nein  
*falls ja:* Procedur / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 4 Hatte der Patient seit 2004 die Symptomatik eines Apoplex mit aphasischen Symptomen oder Extremitätenpareesen für über 24 Stunden?  
 ja  nein  
*falls ja:* Diagnose / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 5 Hatte der Patient seit 2004 die Symptomatik eines Apoplex mit aphasischen Symptomen oder Extremitätenpareesen für weniger als 24 Stunden?  
 ja  nein  
*falls ja:* Diagnose / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 6 Ist der Patient seit 2004 an den Carotiden interveniert oder operiert (TEA, Stent, Dilatation)?  
 ja  nein  
*falls ja:* Procedur / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 7 Ist der Patient seit 2004 an den Becken oder Beinschlagadern mittels Bypass oder TEA operiert oder Katheter-dilatiert worden? (keine Varicosis-Operationen)  
 ja  nein  
*falls ja:* Procedur / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 8 Ist bei dem Patient seit 2004 eine Amputationsoperation durchgeführt worden?  
 ja  nein  
*falls ja:* Procedur / Zeitpunkt / wo behandelt? : \_\_\_\_\_
- 9 Ist der Patient aufgrund seiner chronischen Nierenerkrankung inzwischen dialysepflichtig geworden?  
 ja  nein  
*falls ja:* Zeitpunkt des Beginns / Dialysezentrum? : \_\_\_\_\_
- 10 **Wann wurde das letzte Serumkreatinin im Zeitraum 2004-2009 bei Ihnen bestimmt und wie hoch war es? Liegen Ihnen mehrere Kreatininwerte vor, ist ein beigefügter kumulativer Ausdruck für uns sehr hilfreich!**  
 Datum: \_\_\_\_\_ Kreatinin-Wert: \_\_\_\_\_ (Einheit) \_\_\_\_\_
- 11 Hat der Patient Diabetes mellitus?  
 ja  nein  
*falls ja:* seit wann? : \_\_\_\_\_
- 12 *Falls Diabetes mellitus besteht:* Wird dieser mit Insulin behandelt?  
 ja  nein  
*falls ja:* seit wann? : \_\_\_\_\_

**Vielen Dank für Ihre freundliche Unterstützung!**

## 9.2 Datenerhebungsbogen Patienten

Guten Tag Herr/Frau ...

Mein Name ist Daniel Roth. Ich rufe Sie aus der Klinik für Innere Medizin der Universitätskliniken des Saarlandes an.

Als Sie sich vor 3 Jahren bei uns in ambulanter Behandlung befunden haben, nahmen Sie freundlicherweise an einer klinischen Untersuchung teil, in dessen Rahmen mehrere Ultraschalluntersuchungen durch Frau Reichart und Dr. Heine durchgeführt worden sind.

Ich rufe Sie nun an, da wir herausfinden wollen, wie es unseren Patienten heute geht.

Ich würde mich sehr freuen, wenn Sie deshalb für mich ein paar Minuten Zeit hätten und einverstanden sind, wenn ich Ihnen ein paar Fragen stellen darf in Bezug auf Ihren Gesundheitszustand heute.

Wir wollen wissen, ob die damaligen Ultraschalluntersuchungen geeignet sind, den Krankheitsverlauf bei nierenkranken Personen über die Jahre besser vorherzusagen.

Deswegen sind Ihre Angaben für uns wichtig, um nierenkranke Menschen wie Sie zukünftig noch besser behandeln zu können.

Ich würde Ihnen dann gerne ca. 20 einfache Fragen zu Ihrer Gesundheit stellen.

Wenn Sie auf einzelne Fragen nicht antworten wollen oder nicht antworten können, können Sie diese auch einfach weglassen.

Selbstverständlich unterliegen alle Angaben, die Sie machen, der Schweigepflicht und werden im Rahmen der Studie anonym ausgewertet.

Wären Sie damit einverstanden oder wollen Sie zuerst von mir noch irgendetwas wissen? Also, ich werde dann zusammen mit Ihnen die Fragen durchgehen. Vielen Dank nochmal für Ihr Vertrauen und Ihre Zeit!

### **Patientenbefragung**

Proband \_\_\_\_\_ Befragungsdatum \_\_\_\_\_  
 Name \_\_\_\_\_ geb. \_\_\_\_\_  
 Tel \_\_\_\_\_ Ambulanzpatient:  ja  nein

1 Hatten Sie seit dem tt.mm.2004 einen Herzinfarkt?

Vorinfo: \_\_\_\_\_

ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_

nein

2 Hatten Sie seit dem tt.mm.2004 eine Bypass-Operation?

Vorinfo: \_\_\_\_\_

ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_

nein

3 Hatten Sie seit dem tt.mm.2004 eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

Vorinfo: \_\_\_\_\_

ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_

nein

4 Hatten Sie seit dem tt.mm.2004 einen Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums oder Lähmungen der Gliedmaßen, die länger als 24 Stunden angedauert haben?

Vorinfo: \_\_\_\_\_

ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_

nein

- 5 Hatten Sie seit dem tt.mm.2004 einen Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums oder Lähmungen der Gliedmaßen, die kürzer als 24 Stunden angedauert haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 6 Sind Ihre Halsschlagadern seit dem tt.mm.2004 operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 7 Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern seit dem tt.mm.2004 mittels Bypass operiert oder mittels Katheter aufgedehnt? Hierbei sind keine Operationen von Krampfadern gemeint!  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 8 Ist bei Ihnen seit dem tt.mm.2004 eine Amputationsoperation erforderlich gewesen?  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja wann? \_\_\_\_\_ wo stationär behandelt? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 9 Vorinfo: Zum Erhebungszeitpunkt Raucher?  
 O ja 10 → Rauchen Sie heute noch? O ja O nein  
 O nein 11 → Haben Sie das Rauchen wieder begonnen O ja, wann \_\_\_\_\_ O nein
- 12 Wann haben Sie die letzte Zigarette / Zigarre geraucht? \_\_\_\_\_
- 13 Sind Sie aufgrund Ihrer Nierenerkrankung inzwischen Dialysepflichtig geworden?  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja  
 14 → Seit wann sind Sie dialysepflichtig? \_\_\_\_\_  
 15 → In welchem Dialysezentrum dialysieren Sie? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 16 Ist bei Ihnen eine Nierentransplantation geplant?  
 Vorinfo: \_\_\_\_\_  
 O ja wann? \_\_\_\_\_ wo? \_\_\_\_\_  
 O nein
- 17 Wann wurde das letzte Serum-Kreatinin bestimmt? \_\_\_\_\_
- 18 Von wem wurde das Serum-Kreatinin zuletzt bestimmt? \_\_\_\_\_
- 19 Wer bestimmt bei Ihnen zusätzlich regelmäßig Blutwerte?  
 (cave: Ambulanzpatient?) \_\_\_\_\_
- 20 Wer ist Ihr aktueller Hausarzt? Name \_\_\_\_\_ Ort \_\_\_\_\_
- 21 falls extern: aktueller Nierenfacharzt? Name \_\_\_\_\_ Ort \_\_\_\_\_
- 22 Hat sich Ihr Hausarzt seit 2004 geändert?

O ja → 23 Wer war es zuvor? Name \_\_\_\_\_ Ort \_\_\_\_\_  
O nein

23 Darf ich Ihren Hausarzt / Ihren Facharzt in Bezug auf diese Fragen anrufen?

O ja  
O nein

24 Sind Sie zuckerkrank? *Vorinfo:* \_\_\_\_\_

O ja seit wann? \_\_\_\_\_ → 25 Medikamente? O ja, seit wann: \_\_\_\_\_  
O nein  
26 Insulin? O ja, seit wann: \_\_\_\_\_  
O nein  
O nein

### 9.3 Danksagung

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Gunnar Heine, der mir diese Dissertationsarbeit ermöglicht und mich dabei fortwährend hervorragend unterstützt hat. Er ist mir jederzeit ein sehr engagierter, verständnisvoller, hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner gewesen.

Ebenfalls möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. med. Sarah Seiler für ihre vielfältige jederzeit freundliche und kompetente Unterstützung in allen Phasen der Dissertation sehr danken. Frau Martina Wagner und dem Team des nephrologischen Labors der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes danke ich für ihre exzellente Studienassistentz.

Meinen Dank möchte ich auch an die zahlreichen freundlich kooperierenden ärztlichen Kollegen und nicht zuletzt an die aufgeschlossenen Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, richten.

Meinen Eltern danke ich für ihre moralische Unterstützung.

Abschließend danke ich herzlich meiner Frau Katrin! Ohne ihre große Geduld und ihr umfassendes Verständnis auch in schwierigen Situationen wäre diese Dissertation nicht entstanden.

## 9.4 Lebenslauf

Daniel Thorsten Roth

geboren am 11.12.1979 in St. Wendel

### Schulbildung

1986 – 1990            Grundschule St. Anna, St. Wendel

1990 – 1999            Abitur am Arnold-Janssen-Gymnasium, St. Wendel

### Zivildienst

07/1999 – 06/2000    Zivildienst im Rettungsdienst und Krankentransport als Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz St. Wendel

### Studium

10/2000 – 10/2007    Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

09/2002                Ärztliche Vorprüfung

2003 – 2006            Famulaturen in Innere Medizin, Allgemeinmedizin, Geriatrischer Rehabilitation, Neurologie

10/2003                Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

09/2006                Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2006 – 09/2007    Praktisches Jahr am Universitätsklinikum des Saarlandes (Chirurgie, Innere Medizin, Anästhesie)

10/2007                Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt

### Beruf

11/2007 – 12/2007    Assistenzarzt in Weiterbildung, Geriatrische Reha-Klinik, Kreis-  
krankenhaus St. Ingbert (Chefarzt Dr. med. Eckert)

---

01/2008 – 09/2011 Assistenzarzt in Weiterbildung Innere Medizin, St. Johannis-Krankenhaus Landstuhl (Chefarzt Dr. med. Gabriel)

seit 10/2011 Assistenzarzt in Weiterbildung Innere Medizin und Kardiologie, Westpfalz-Klinikum GmbH Kaiserslautern, Innere Medizin II (Chefarzt Prof. Dr. med. Schumacher)