

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

**Die Hypoferritinämie, der lange gesuchte Mediator des  
Zusammenhangs zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und  
erhöhter renaler und kardiovaskulärer Mortalität bei  
chronischer Nierenerkrankung?**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2022  
vorgelegt von  
Franziska Sandermann  
geboren am 05.02.1993 in Lauf an der Pegnitz

Tag des Kolloquiums: 05.07.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunnar H. Heine

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Berthold Seitz

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 5  |
| 1. Zusammenfassung .....  | 6  |
| 2. Summary .....  | 8  |
| 3. Einleitung .....   | 10 |
| 3.1. Bedeutung und Pathogenese der Anämie und des Eisenmangels bei chronisch<br>nierenkranken Menschen.....   | 10 |
| 3.1.1. Anämie und Eisenmangel als häufige Komorbiditäten der chronischen<br>Nierenerkrankung: Prävalenz und Diagnose.....   | 10 |
| 3.1.2. Physiologische Grundlagen des Eisenstoffwechsels.....  | 12 |
| 3.1.3. Pathophysiologie von Anämie und Eisenmangel bei Menschen mit CKD .....   | 14 |
| 3.2. Anämie, Eisenmangel und das phosphaturische Hormon Plasma-FGF-23 als<br>kardiovaskuläre Risikofaktoren bei CKD .....   | 18 |
| 3.3. Assoziation eines Eisenmangels mit erhöhtem Plasma-FGF-23 im Rahmen der chronischen<br>Nierenerkrankung .....  | 20 |
| 3.4. Ist die Hypoferritinämie der pathophysiologisch relevante Mediator des Zusammenhangs<br>zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und gesteigerter renaler und kardiovaskulärer Mortalität<br>bei chronischer Nierenerkrankung?..... | 22 |
| 4. Material und Methoden .....  | 23 |
| 4.1. CARE for HOME Studie .....   | 23 |
| 4.1.1. Studiendesign .....  | 23 |
| 4.1.2. Einschlusskriterien .....  | 23 |
| 4.1.3. Ausschlusskriterien .....  | 25 |
| 4.1.4. Besondere Patientencharakteristika und Studienendpunkte .....  | 25 |
| 4.2. Ablauf der jährlichen Nachuntersuchung.....  | 27 |
| 4.2.1 Labordiagnostik bei der jährlichen Nachuntersuchung .....   | 29 |
| 4.3. Bestimmung des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23.....   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3.1. Testprinzip der Plasma-FGF-23-Nachweisverfahren .....  | 30 |
| 4.3.2. Durchführung des im Rahmen der CARE for HOME Studie verwendeten Nachweisverfahrens .....   | 32 |
| 4.4. Statistik und Datenerfassung .....   | 34 |
| 5. Ergebnisse .....   | 35 |
| 5.1. Baselinecharakteristika.....   | 35 |
| 5.2. Assoziation zwischen Plasma-Ferritin, Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels und der Nierenfunktion .....   | 38 |
| 5.3. Prüfung der klinischen Relevanz der Hypoferritinämie als möglichem Prädiktor kardiovaskulärer und renaler Ereignisse bei chronischer Nierenerkrankung..... | 43 |
| 6. Diskussion .....   | 50 |
| 6.1. Der chronisch nierenkranke Mensch als kardiovaskulärer Hochrisikopatient.....  | 50 |
| 6.2. Plasma-FGF-23 als Schlüsselhormon der CKD.....   | 57 |
| 6.3. Der pathophysiologische Hintergrund und die diagnostischen Herausforderungen eines Eisenmangels bei CKD .....  | 62 |
| 6.4. Die mögliche prognostische Bedeutung der Interaktion zwischen einem Eisenmangel und Plasma-FGF-23 bei CKD .....  | 68 |
| 6.5. Limitationen .....   | 72 |
| 6.6. Zusammenfassung und Ausblick .....   | 75 |
| 7. Literatur .....  | 76 |
| 8. Danksagung.....  | 93 |
| 9. Lebenslauf .....   | 96 |

# Abkürzungsverzeichnis

|               |  |
|---------------|--|
| ADHR          | Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis   |
| CKD           | Chronic Kidney Disease, chronische Nierenerkrankung  |
| CKD-MBD       | Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorders, CKD-assoziierte Störung des Mineral- und Knochenstoffwechsels |
| CRP           | C-reaktives Protein  |
| EPO           | Erythropoetin  |
| ESRD          | End Stage Renal Disease, terminale Niereninsuffizienz  |
| GFR           | Glomeruläre Filtrationsrate  |
| KDIGO         | Kidney Disease: Improving Global Outcomes  |
| K/DOQI        | Kidney Disease Outcome Quality Initiatives   |
| LVH           | Linksventrikuläre Hypertrophie   |
| NICE          | National Institute for Health and Care Excellence 2015   |
| NHANES        | National Health and Nutrition Examination Survey   |
| Plasma-FGF-23 | Plasma Fibroblast Growth Factor 23 (phosphaturisches Hormon)   |
| PTH           | Parathormon  |
| sHPT          | Sekundärer Hyperparathyreoidismus  |
| TSAT          | Transferrin Saturation, Transferrinsättigung   |

# 1. Zusammenfassung

## **Könnte eine Hypoferritinämie der lange gesuchte Mediator des Zusammenhangs zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und erhöhter renaler und kardiovaskulärer Mortalität bei chronischer Nierenerkrankung sein?**

**Hintergrund:** Menschen mit chronischer Nierenerkrankung (CKD; Chronic Kidney Disease) weisen im Vergleich zu der Normalbevölkerung eine stark erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf, die nicht allein durch die höhere Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren bei CKD-Patienten erklärt werden kann. Stattdessen wurden über die letzten Jahre neuere „nicht-klassische“ kardiovaskuläre Risikofaktoren beschrieben, zu denen erhöhte Spiegel des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23 (fibroblast growth factor 23) und eine Eisenmangelanämie zählen. Ebenso sind erhöhte Spiegel von Plasma-FGF-23 und die Eisenmangelanämie Prädiktoren der CKD-Progression zur Dialysepflichtigkeit.

Rezente Studien konnten zeigen, dass bei nierengesunden Menschen ein Eisenmangel kausal mit erhöhten Plasma-FGF-23-Spiegeln assoziiert ist. Dieser Zusammenhang wurde nun in der CARE for HOME Studie für CKD-Patienten untersucht.

Hierzu sollten zwei Hypothesen überprüft werden: Zunächst wurde postuliert, dass auch bei chronisch nierenkranken Menschen eine Hypoferritinämie als Eisenmangelindikator mit erhöhten Plasma-FGF-23-Spiegeln assoziiert ist. Nachfolgend wurde postuliert, dass die epidemiologische Assoziation zwischen Plasma-FGF-23 und kardiovaskulären sowie renalen Ereignissen nach Korrektur für Plasma-Ferritin abgeschwächt wird.

Bei Bestätigung dieser Hypothesen, könnte ein Eisenmangel eher als eine direkte Wirkung von Plasma-FGF-23 pathophysiologischer Mediator der Assoziation von Plasma-FGF-23 mit renalen und kardiovaskulären Ereignissen sein.

**Methodik:** Von 2008 bis 2015 wurden im Rahmen der Einschlussuntersuchungen der prospektiven CARE for HOME Studie 544 Patienten der K/DOQI-Stadien 2-4 klinisch untersucht. Aus Blutproben erfolgte die Bestimmung von Plasma-FGF-23, Plasma-Ferritin und weiteren Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels. Zur Messung von Plasma-FGF-23 wurde das Immotopics® Test Kit (San Clemente, CA, USA), ein Sandwich-Immunoassay zum Nachweis des C-terminalen Plasma-FGF-23, verwendet. Plasma-Ferritin wurde mittels des Elecsys® Ferritin Tests, einem ElektroChemilumineszenz ImmunoAssay „ECLIA“ der

Firma Roche, bestimmt. Die Nierenfunktion wurde als geschätzte („estimated“) glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) durch die Kreatinin-basierte MDRD-Formel bestimmt.

Nachfolgend führten wir (in der Zeit von Oktober 2014 - Oktober 2015 durch die Verfasserin der vorliegenden Promotionsschrift) jährliche Nachbeobachtungen der Studienteilnehmer durch, bei welchen das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, definiert als atherosklerotische Ereignisse, und renaler Ereignisse, definiert als Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit oder Tod, durch einen standardisierten Fragebogen erfasst und mittels Krankenblattstudium durch zwei Ärzte unabhängig voneinander verifiziert wurde.

**Ergebnisse:** Zu Studieneinschluss konnte eine Assoziation fortgeschrittener GFR-Kategorien mit erhöhtem Plasma-FGF-23 ( $p < 0,001$ ), erhöhtem Plasma-Phosphat ( $p < 0,001$ ), einer gesteigerten fraktionellen Phosphatexkretion ( $p < 0,001$ ) sowie erhöhtem Serum-Parathormon ( $p < 0,001$ ), nicht aber mit niedrigem Plasma-Ferritin ( $p = 0,821$ ) gezeigt werden. Plasma-Ferritin und Plasma-FGF-23 waren negativ korreliert ( $r = -0,143$ ,  $p < 0,001$ ).

Im Rahmen der univariaten Kaplan-Meier Analysen war nach Stratifizierung der Patienten in Tertile Plasma-FGF-23 mit kardiovaskulären (Log-rank test  $p < 0,001$ ) und renalen ( $p < 0,001$ ) Ereignissen assoziiert. Hingegen waren Ferritin-Tertile in univariaten Kaplan-Meier Analysen weder mit dem Auftreten kardiovaskulärer (Log-rank test  $p = 0,334$ ) noch mit dem renaler Ereignisse assoziiert ( $p = 0,287$ ). In Cox-Regressionsanalysen blieb Plasma-FGF-23 auch nach Korrektur für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, für die eGFR und Plasma-Ferritin weiter Prädiktor sowohl kardiovaskulärer (HR 2,01 [KI 1,17-3,43],  $p = 0,01$ ) als auch renaler (HR 3,29 [KI 1,71-6,33],  $p < 0,001$ ) Ereignisse, während Plasma-Ferritin bereits in univariaten Cox-Regressionsanalysen nicht als kardiovaskulärer (HR 0,98 [KI 0,68-1,44],  $p = 0,91$ ) oder renaler (HR 1,10 [KI 0,74-1,64],  $p = 0,65$ ) Prädiktor nachgewiesen werden konnte.

**Diskussion:** Es konnte gezeigt werden, dass auch bei chronisch nierenkranken Menschen eine Hypoferritinämie als Eisenmangelindikator mit erhöhtem Plasma-FGF-23 assoziiert ist. Allerdings konnte ein Einfluss des Plasma-Ferritins auf das ereignisfreie Überleben der Patienten nicht bestätigt werden, während Plasma-FGF-23 auch nach Korrektur für Plasma-Ferritin unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre und auch renale Ereignisse blieb.

Eine Limitation der Studie besteht darin, dass zur Diagnose des Eisenmangels ausschließlich Plasma-Ferritin herangezogen wurde. Künftige Studien sollten weitere Parameter des Eisenstatus wie etwa die Transferrinsättigung (TSAT) oder auch den löslichen Transferrin-Rezeptor (sTfR) analysieren, um eine möglicherweise sensitivere Selektion der

CKD-Patienten mit Eisenmangel zu gewährleisten und so die prognostische Bedeutung eines Eisenmangels für das Überleben dieser Patienten noch besser beurteilen zu können.

## 2. Summary

### **May low plasma ferritin levels possibly be the much longed for mediator of the correlation between high plasma FGF-23 and the increased renal and cardiovascular mortality in patients with CKD?**

**Background:** Compared to individuals from the general population, patients with chronic kidney disease (CKD) show an increased cardiovascular morbidity and mortality, which cannot be explained by a higher prevalence of traditional cardiovascular risk factors alone. Instead, several new “non-traditional” cardiovascular risk factors have been described in the last years, which comprise both high plasma levels of the phosphaturic hormone FGF-23 and iron deficiency anemia. In addition, high plasma FGF-23 and iron deficiency anemia predict the progression of non dialysis dependent CKD to end stage renal disease (ESRD).

Recent studies indicated a causal association between elevated plasma FGF-23 levels and iron deficiency among individuals with intact renal function. Within the CARE for HOME study, it was aimed to analyse this association among patients with CKD.

Two hypotheses were specifically tested: First it was hypothesized that among CKD patients low plasma ferritin, as a marker of iron deficiency, is associated with elevated plasma FGF-23. Secondly, it was hypothesized that the epidemiological association between plasma FGF-23 and future cardiovascular and renal events is attenuated when adjusting for plasma ferritin.

If these hypotheses can be confirmed, iron deficiency, rather than a direct detrimental effect of high plasma FGF-23, may be the actual causal mediator that pathophysiologically links high plasma FGF-23 with cardiovascular or renal events.

**Methods:** Between 2008 and 2015, 544 patients with CKD in K/DOQI-Stages 2-4 were included into the prospective CARE for HOME study. At study initiation, all study participants were clinically examined and blood samples for the measurement of plasma FGF-23, plasma ferritin and other parameters of the calcium-phosphate homeostasis were taken.

Plasma FGF-23 was analysed with the Immutopics® test kit, which detects c-terminal plasma FGF-23 via a sandwich-immunoassay. Plasma-ferritin was measured by means of the Elecsys® Ferritin test, an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) by Roche. We assessed the patients' kidney function as "estimated glomerular filtration rate" (eGFR), which was calculated by using the creatinine-based MDRD equation.

Subsequently, annual follow up examinations of the study participants were conducted (follow up examinations from October 2014 - October 2015 were conducted by this thesis' author). By means of a standardized questionnaire the incidence of atherosclerotic cardiovascular events and renal events, defined as halving of eGFR, CKD progression to ESRD and / or death, was assessed. By chart review, two physicians independently verified all events.

**Results:** At study initiation, more advanced CKD stages were associated with higher plasma FGF-23 ( $p < 0.001$ ), higher plasma phosphate ( $p < 0.001$ ), increased fractional phosphate excretion ( $p < 0.001$ ) and higher serum parathormone ( $p < 0.001$ ), but not with lower plasma ferritin ( $p = 0.821$ ). Plasma ferritin and plasma FGF-23 correlated negatively ( $r = -0.143$ ,  $p < 0.001$ ). When stratifying patients into tertiles for plasma FGF-23 or plasma ferritin, respectively, high plasma FGF-23 was associated with cardiovascular (log-rank test  $p < 0.001$ ) and with renal ( $p < 0.001$ ) events in univariate Kaplan-Meier analyses, whereas plasma ferritin tertiles were not (cardiovascular events  $p = 0.334$ ; renal events  $p = 0.287$ ). In Cox regression analyses, plasma FGF-23 remained a strong predictor of both cardiovascular (HR 2,01 [CI 1.17-3.43],  $p = 0.01$ ) and renal (3.29 [CI 1.71-6.33],  $p < 0.001$ ) events after adjusting for traditional cardiovascular risk factors, eGFR and plasma ferritin. In contrast, plasma ferritin failed to predict both cardiovascular events (HR 0.98 [CI 0.68-1.44],  $p = 0.91$ ) and renal events (HR 1.10 [CI 0.74-1.64],  $p = 0.65$ ) in Cox regression analyses even before adjustment for confounders.

**Discussion:** In this study low plasma ferritin levels - as a marker of iron deficiency – were associated with high levels of plasma FGF-23 in a cohort of CKD patients. However, plasma ferritin did not affect event-free survival, whereas plasma FGF-23 remained an independent predictor of cardiovascular as well as renal events even after adjusting for plasma ferritin. As potential limitation, iron status was evaluated solely by measuring plasma ferritin. Future studies should analyse further parameters of the iron homeostasis such as transferrin saturation (TSAT) and soluble transferrin receptor (sTfR). This might allow a superior identification of CKD patients with iron deficiency und therefore a more precise evaluation of the prognostic implications of iron deficiency on the clinical outcome of these patients.

## **3. Einleitung**

### **3.1. Bedeutung und Pathogenese der Anämie und des Eisenmangels bei chronisch nierenkranken Menschen**

#### **3.1.1. Anämie und Eisenmangel als häufige Komorbiditäten der chronischen Nierenerkrankung: Prävalenz und Diagnose**

Menschen mit chronischer Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) weisen sehr häufig eine Anämie auf [15, 89, 119, 141, 193]. Laut der World Health Organization (WHO) ist eine Anämie als Hämoglobinkonzentration  $< 13,0$  g / dl bei Männern und  $< 12,0$  g / dl bei Frauen definiert [1]. Diese Grenzwerte gelten laut den internationalen Leitlinien der KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) auch für Erwachsene mit CKD [3].

Die Pathogenese der Anämie bei chronischer Nierenerkrankung ist multifaktoriell [119]. Bei Progression der Nierenerkrankung kommt es durch eine Verminderung des funktionalen Nierengewebes und durch eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu einer Beeinträchtigung der Erythropoetin-Produktion, wodurch die Erythropoese nicht mehr adäquat an den Bedarf des Körpers angepasst werden kann [17, 119, 143]. Das Glykoprotein-Hormon Erythropoetin (EPO) wird hauptsächlich renal in interstitiellen peritubulären Fibroblasten gebildet [112] und bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken freigesetzt [116]. EPO ist essentiell für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Erythrozytenvorstufen im Knochenmark [98]. Die physiologischen Effekte von EPO münden in eine gesteigerte Erythropoese mit Anstieg der Hämoglobinkonzentration [116]. Ein weiteres führendes Merkmal der Anämie bei CKD ist die im Vergleich zu Gesunden stark veränderte Eisenhomöostase mit verminderter gastrointestinaler Eisenresorption und verminderter Verfügbarkeit des körpereigenen Speichereisens für die Erythropoese [17, 222].

Deutlich wird die hohe epidemiologische Relevanz der Anämie und des Eisenmangels bei chronisch nierenkranken Menschen etwa bei Betrachtung der Daten der NHANES Studie, welche im Abstand von zwei Jahren den Gesundheitsstatus einer repräsentativen Stichprobe der US-amerikanischen Bevölkerung erfasst. In den statistischen Erhebungen zwischen den Jahren 2007 bis 2010 war die Prävalenz der Anämie unter chronisch nierenkranken Menschen mit 15,4% etwa doppelt so hoch wie die Prävalenz innerhalb der Grundgesamtheit, in welcher 7,6% aller Menschen eine Anämie aufwiesen [193].

Hierbei wurde beobachtet, dass die Anämieprävalenz mit dem Schweregrad der CKD zunahm; so wies im CKD-Stadium 1<sup>1</sup> etwa jede zwölfte, im CKD-Stadium 3<sup>1</sup> bereits jede sechste und im CKD-Stadium 5<sup>1</sup> schon jede zweite Person eine Anämie auf [193]<sup>1</sup>. Ältere Analysen hatten im Rahmen von NHANES III (1988 - 1994) bereits eine nur grenzwertig eingeschränkte Nierenfunktion mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Anämie assoziiert. Neben der Prävalenz nahm dabei auch der Ausprägungsgrad der Anämie zu, je weiter die Nierenfunktion abnahm [15]. Dies weist darauf hin, dass eine Anämie bereits in frühen CKD-Stadien auftritt und mit dem Fortschreiten der Nierenerkrankung an Bedeutung gewinnt. Darüber hinaus wurde erkannt, dass viele Menschen mit CKD zu geringe Eisenreserven aufweisen, um langfristig eine adäquate Erythropoese aufrechtzuerhalten [89]. Dies wurde in weiteren NHANES-Analysen untersucht, welche bei bis zu 59% der männlichen und 73% der weiblichen Personen mit CKD eine Verminderung des Plasma-Ferritins < 100 ng / ml oder der Transferrinsättigung (TSAT) < 20% nachweisen konnten; bei Betrachtung beider Parameter in Kombination traf dies noch auf etwa 20% zu [55]. Ein Plasma-Ferritin < 100 ng / ml bei gleichzeitig verminderter TSAT < 20% entspricht dabei laut den evidenzbasierten britischen NICE-Leitlinien (National Institute for Health and Care Excellence 2015) zur Anämie bei CKD-Patienten den Grenzwerten für die Diagnose eines manifesten Eisenmangels [5]. Die hohe Prävalenz von Anämie und Eisenmangel bei CKD-Patienten indiziert die regelmäßige Kontrolle relevanter Laborparameter insbesondere in fortgeschrittenen CKD-Stadien [3]. Hierbei sollten entsprechend der internationalen Leitlinien der KDIGO [3] neben der Hämoglobinkonzentration auch das Plasma-Ferritin und die TSAT bestimmt werden. Während das Plasma-Ferritin hierbei orientierende Informationen über den Zustand der Eisenreserven des Körpers gibt und mit dem Speichereisen im Knochenmark korreliert [90], ist die TSAT ein Surrogatparameter der Verfügbarkeit des Eisens für die Erythropoese [3]. Plasma-Ferritin und TSAT sollten dabei gemeinsam interpretiert werden [5], um eine ausreichend hohe Spezifität und Sensitivität der Anämie- und Eisenmangeldiagnose zu gewährleisten [104].

Generell wird bei chronisch nierenkranken Menschen zwischen einem absoluten Eisenmangel, der durch eine vollständige Ausschöpfung der Körpereisenspeicher gekennzeichnet ist, und einem funktionellen Eisenmangel, bei dem zwar eine Störung der Eisenhomöostase vorliegt, das Körpereisenreservoir jedoch erhalten oder sogar vergrößert sein kann, unterschieden. Die Gemeinsamkeit beider Pathologien ist die verminderte Verfügbarkeit des Körpereisens für wichtige Stoffwechselprozesse wie etwa die Erythropoese [17, 133].

---

<sup>1</sup> Quelle [153] bezieht sich hinsichtlich der Stadieneinteilung der CKD auf Empfehlungen der National Kidney Foundation 2012. Die aktuelle Einteilung ist unter „Material und Methoden“ → „Einschlusskriterien“ dargestellt.

### 3.1.2. Physiologische Grundlagen des Eisenstoffwechsels

Ein gesunder Mensch nimmt über die Nahrung 1-2 mg Eisen pro Tag auf. Hierdurch werden kontinuierliche Eisenverluste durch Haarausfall, Epithelabschilferung oder Menstruation ausgeglichen [50, 217]. In der Nahrung kommt Eisen vorrangig in zwei Formen vor - als anorganisches Non-Häm-Eisen vornehmlich aus pflanzlichen Quellen oder als Häm-Eisen meist tierischen Ursprungs. Während das Non-Häm-Eisen in dreiwertiger Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) vorliegt, ist das zweiwertige Häm-Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) Zentralatom der Häm-Komplexverbindung [50, 133].

Oral aufgenommenes Eisen wird in Duodenum und proximalem Jejunum durch Enterozyten der Darmmukosa resorbiert [65]. Das Non-Häm-Eisen wird dazu zunächst durch eine membranständige Ferrireduktase in seine zweiwertige Form überführt [144], um dann durch den DMT-1-Transporter aufgenommen werden zu können [75]. Der Mechanismus der Häm-Eisen-Resorption ist demgegenüber noch nicht abschließend geklärt [217]; dem ehemals als Häm-Transporter geltenden HCP-1 [183] wird mittlerweile primär die Funktion eines Folat-Transporters zugeschrieben [118, 169]. Nach seiner Resorption wird das Häm-Eisen durch die Hämoxygenase-1 degradiert [170] und der Eisen-Anteil freigesetzt. Unabhängig seines Resorptionsmechanismus wird Eisen intrazellulär in den „labilen Eisenpool“, ein bisher nur unscharf charakterisiertes Zell-Kompartiment, eingespeist [50, 155]. Aus diesem wird es dann metabolischen Prozessen zugeführt oder als inertes Speichereisen in Form von Ferritin retiniert. Bei peripherem Bedarf wird Eisen mittels Ferroportin als Eisenexport-Protein [145] an der basolateralen Enterozytenmembran an das Interstitium abgegeben [50, 217]. Hierbei wird Eisen durch eine Ferroxidase wie Haephaestin oxidiert [214]; nur so kann es an Apotransferrin als Transportprotein gebunden und in Transferrin-adhärenter Form in die Blutbahn freigesetzt werden [72]. Transferrin wird peripher von Eisen-defizientem Gewebe über den Transferrin-Rezeptor-1 ( $\text{TfR}_1$ ) gebunden; der entstehende  $\text{TfR}_1$ -Transferrin-Komplex wird internalisiert, endosomal degradiert und Eisen dem Zellstoffwechsel zugeführt [50, 72].

Überdies existieren noch weitaus mehr Wege der Eisenaufnahme auf zellulärer Ebene [50], so können Makrophagen Haptoglobin-gebundenes Hämoglobin durch den CD163-Transporter aufnehmen und den Eisen-enthaltenden Häm-Anteil nutzen [117]. Darüber hinaus tragen spezialisierte Makrophagen in Milz, Leber und Knochenmark als Teil des retikuloendothelialen Systems (RES) durch Phagozytose seneszenten Erythrozyten maßgeblich zur Speicherung, Neuaufbereitung und Wiederverwertung des körpereigenen Eisens bei [50, 155]. Dieses physiologische Recycling gleicht den Großteil (20-25 mg) des täglichen Eisenbedarfs (für die Erythropoese) aus, nur etwa 1-2 mg werden durch intestinale Eisenresorption gedeckt [217].

Die Regulation des Eisenstoffwechsels ist vielschichtig und bedarf zahlreicher Sensoren und Effektoren, um den Eisengehalt des Blutes konstant zu halten [155]. Dies ist notwendig, da Eisen einerseits für elementare Stoffwechselprozesse in ausreichender Menge zur Verfügung stehen muss, während sich andererseits ein zu hoher Eisengehalt des Blutes schnell schädlich auswirkt, indem die Bindungskapazität von Eisen-Transportproteinen überschritten wird und ungebundenes Eisen als hochreaktive Spezies toxische Effekte bewirken kann [217].

Eisen wird nur geringfügig aktiv renal ausgeschieden; die Eisenexkretion geschieht vorrangig passiv durch kontinuierliche Eisenverluste [50, 154]. Somit greifen Regulationsmechanismen vorwiegend auf Ebene der Eisenaufnahme und Eisenbereitstellung an [155, 217]:

Auf zellulärer Ebene spielen die RNA-bindenden Proteine (RBP's) IRP1 und IRP2 eine zentrale Rolle. Sie binden spezifische Bereiche der mRNA, die „Iron Responsive Elements“ (IRE's). Diese Interaktion dient der posttranskriptionalen Regulation der mRNA von Proteinen des Eisenstoffwechsels wie dem TfR<sub>1</sub>, Ferroportin und Ferritin [154]. Das IRP/IRE-System wird maßgeblich durch den Füllungszustand der Eisenreserven aber auch durch die Oxygenierung einer Zelle beeinflusst. So wird bei Eisenmangel der TfR<sub>1</sub> vermindert abgebaut, sowie die Translation von Ferroportin und Ferritin gehemmt. Folglich wird die zelluläre Eisenaufnahme über den TfR<sub>1</sub> gesteigert, die Eisenfreisetzung über Ferroportin und die Eisenspeicherung in Form von Ferritin wiederum gehemmt. Die intrazelluläre Eisenkonzentration steigt und Eisen steht dem Zellstoffwechsel zur Verfügung [155]. In diesem Zusammenhang erwähnenswert erscheinen auch die Transkriptionsfaktoren der HIF-Familie (Hypoxia inducible factors), die Hypoxie-abhängig Signalkaskaden induzieren. Der HIF-2-Komplex beeinflusst dabei durch Steigerung der EPO-Transkription die Regulation der Erythropoese [98]. Dessen Untereinheit HIF 2 $\alpha$  weist in seiner mRNA ein IRE-Motiv auf [174]; es wird angenommen, dass hierüber indirekt eine Regulation der EPO-Produktion durch das IRP/IRE-System stattfinden und so eine Anpassung der Erythropoeseaktivität an die generelle Eisenverfügbarkeit erfolgen kann [154].

Auf systemischer Ebene spielt das hepatisch sezernierte Peptidhormon Heparin eine wichtige Rolle. Es hemmt durch die Inaktivierung von Ferroportin die intestinale Eisenresorption und die Eisenfreisetzung aus dem RES [159]. Bei Eisenmangel oder hoher Erythropoeseaktivität wird die Heparinsynthese gehemmt, wodurch mehr Eisen resorbiert und aus dem RES mobilisiert wird. Demgegenüber wird die Heparinsynthese durch einen Eisenüberschuss, aber auch durch inflammatorische Stimuli gesteigert, sodass weniger Eisen freigesetzt wird [50, 69].

Für die detaillierte Darstellung der bisher bekannten Regulatoren der Eisenhomöostase und ihrer Wechselwirkungen wird auf die angeführten Übersichtsartikel verwiesen [155, 217, 226].

### 3.1.3. Pathophysiologie von Anämie und Eisenmangel bei Menschen mit CKD

Bei Menschen mit CKD ist die intestinale Eisenaufnahme gestört [17]. Hierfür ist maßgeblich eine chronische Mikroinflammation verantwortlich. Diese entspricht einer durch chronische Entzündungsprozesse bedingten Aktivierung des Immunsystems mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch CD<sup>3+</sup> T-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Einige der Zytokine wie etwa TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) sowie verschiedene Interleukine beeinflussen die Regulation des Eisenstoffwechsels [222]. TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  führen dabei zu einer vermehrten Expression des DMT1-Transporters mit gesteigerter Eisenaufnahme insbesondere in aktivierte Makrophagen des RES. Zusätzlich kommt es durch die Herabregulation der Ferroportin-Expression zu einer reduzierten Eisenfreisetzung aus diesen Zellen [134, 222]. Darüber hinaus führen Interleukin-1 $\beta$  [106] und Interleukin-6 zu einer gesteigerten hepatischen Synthese des Peptidhormons und Akute-Phase-Proteins Hecpidin [158, 160]. Hecpidin inaktiviert Ferroportin [159], welches als einziges bekanntes Eisenexportprotein sowohl auf der Zellmembran von Enterozyten und Hepatozyten, als auch auf der von Makrophagen des RES exprimiert wird [69, 226]. Mit Voranschreiten der CKD finden sich im Blut betroffener Patienten zunehmend erhöhte Serum-Hecpidinspiegel [205]; hieraus ergeben sich zwei wesentliche Konsequenzen für die Eisenhomöostase:

Zum einen kommt es zu einer reduzierten Eisenaufnahme über den Darm. Eisen wird zwar noch über den DMT-1 resorbiert, dessen Expression primär durch den Eisenstatus und die Oxygenierung der Enterozyten reguliert wird [154], aufgrund der Inaktivierung von Ferroportin wird das resorbierte Eisen aber nur noch unzureichend in die Blutbahn abgegeben [159]. Infolgedessen kumuliert das Eisen in den Enterozyten und wird im Rahmen der kontinuierlichen Epithelregeneration mit entstehendem Zelldetritus abgeschilfert [50].

Zum anderen wird Eisen zwar vermehrt in Makrophagen des RES aufgenommen, kann dann aber - analog zu den intestinalen Prozessen - nur eingeschränkt wieder freigesetzt werden. Dies mündet in einer voranschreitenden intrazellulären Eisenretention im RES [222]. Da der tägliche Eisenbedarf für die Erythropoese überwiegend durch Recyclingvorgänge des RES gedeckt wird und die Inaktivierung von Ferroportin auch die Eisenmobilisation aus hepatozytären Speichern hemmt, steht das Eisen dem Körper bald nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung. Im weiteren zeitlichen Verlauf entsteht hieraus ein funktioneller Eisenmangel, respektive eine (Eisenmangel-) Anämie [217].

Ein funktioneller Eisenmangel kann isoliert oder kombiniert mit einem absoluten Eisenmangel vorliegen. Bei absolutem Eisenmangel sind die Eisenreserven des Körpers aufgebraucht; die externe Eisenzufuhr kann den endogenen Bedarf nicht mehr kompensieren [112]. Ursächlich sind meist eine gestörte Eisenresorption, Mangelernährung sowie chronischer Blutverlust [34]. Neben Auswirkungen auf die Regulation des Eisenstoffwechsels werden einigen Zytokinen wie etwa TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und den Interferonen, besonders dem INF- $\gamma$  [196], auch Effekte auf Erythrozyten-Vorstufen zugeschrieben [146, 216]. Hierbei kommt es zu einer inflammatorisch bedingten Induktion der Apoptose von Erythrozyten-Vorläuferzellen, einer Herabregulation von EPO-Rezeptoren auf Erythrozyten-Vorstufen [196] sowie zu einer Beeinträchtigung der Bildung und Wirkung des Glykoprotein-Hormons EPO selbst [222].

EPO wird Hypoxie-abhängig hauptsächlich renal gebildet; als Wachstumsfaktor bindet es EPO-Rezeptoren auf Erythrozyten-Vorstufen im Knochenmark und ist essenziell für deren Proliferation und Differenzierung. EPO führt physiologisch durch Induktion der Erythropoese zu einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Blut [98]. Bei nierengesunden Menschen induziert EPO bei gesteigerter Erythropoese, beispielsweise im Rahmen einer akuten Blutung, die Synthese des Hormons „Erythroferron“ (ERFE) in Erythroblasten im Knochenmark. ERFE supprimiert Heparin und hemmt dessen molekulare Effekte; hierbei wird Eisen vermehrt intestinal resorbiert und gespeichertes Körpereisen zunehmend mobilisiert, um die adäquate Eisenversorgung der „(Stress-) Erythropoese“ zu garantieren [107, 108]. In einer rezenten Studie wurde gezeigt, dass auch bei Menschen mit CKD jeweils höhere Serum-EPO-Spiegel mit höheren Serum-ERFE-Spiegeln korrelierten; allerdings konnte keine Korrelation zwischen Serum-ERFE und Serum-Heparin festgestellt werden. Es wird daher angenommen, dass bei CKD die ERFE-vermittelte Heparin-Suppression durch andere Einflussfaktoren, wie etwa die CKD-assoziierte, Zytokin-vermittelte Heparin-Induktion, nivelliert wird [80].

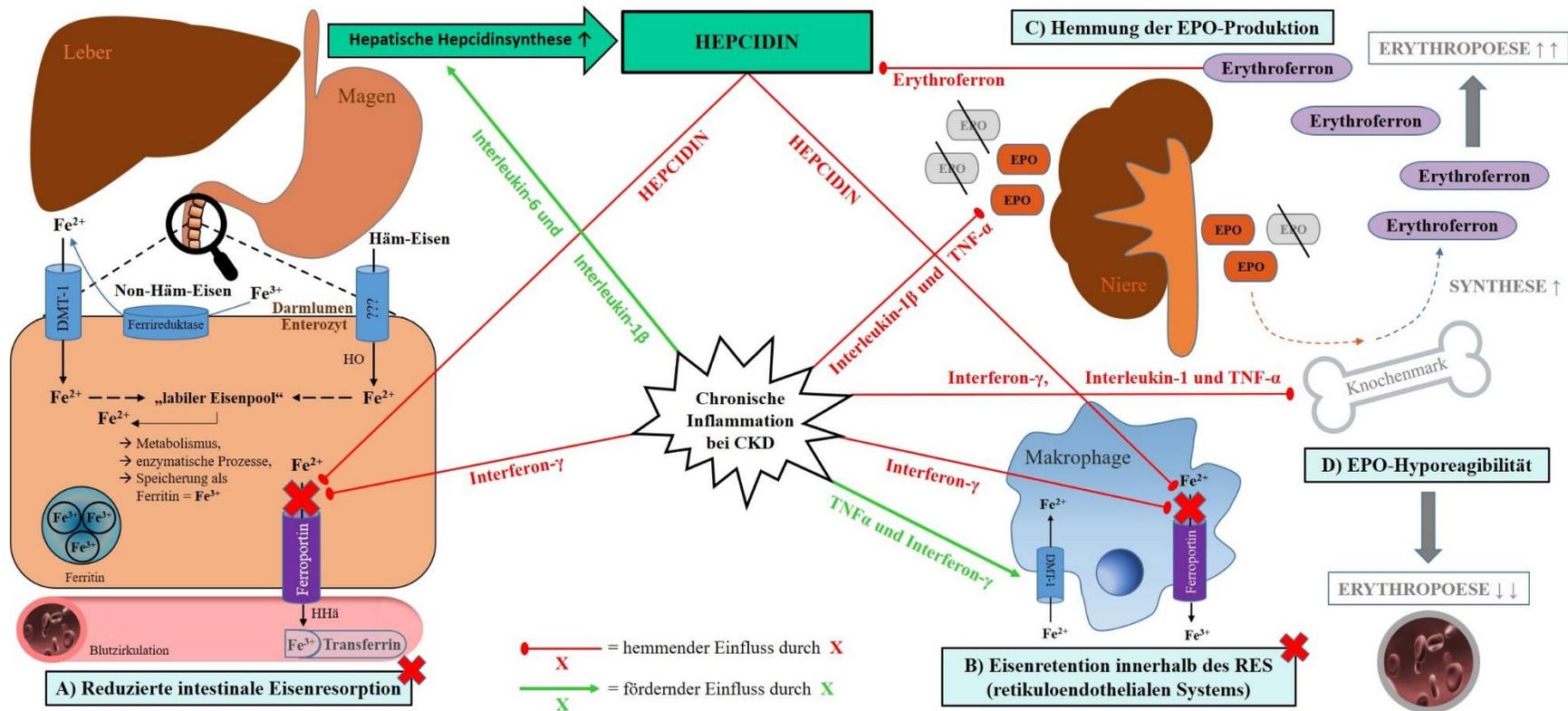
Diese CKD-assoziierten chronisch-inflammatorischen Prozesse haben darüber hinaus noch weitere Folgen. So hemmen proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder indirekt auch Interleukin-1 $\beta$  die EPO-Produktion selbst [51, 99]. Dabei nimmt die renale EPO-Produktion mit Voranschreiten der CKD ohnehin durch progrediente fibrotische Umbauprozesse ab, welche die Transdifferenzierung der EPO-synthetisierenden peritubulären Fibroblasten zu Myofibroblasten beinhalten [192]. Langfristig resultiert hieraus ein EPO-Mangel [112]. Deswegen kommt es bei anämischen chronisch nierenkranken Menschen im Vergleich zu anämischen nierengesunden Menschen zu einem deutlich geringeren reaktiven EPO-Anstieg; dementsprechend weisen CKD-Patienten häufig ein im Hinblick auf den Schweregrad ihrer

Anämie unverhältnismäßig niedriges Serum-EPO auf, wenngleich das Serum-EPO zumeist innerhalb des jeweiligen laborchemischen Referenzbereichs oder sogar leicht oberhalb der Normgrenze liegt [17, 143]. Erschwerend kommt ein vermindertes Ansprechen des hämatopoetischen Zielgewebes auf EPO hinzu, welches durch eine Abnahme der EPO-Rezeptordichte auf den hämatopoetischen Zielzellen selbst [196], die Fehlregulation des Eisenstoffwechsels sowie verschiedene Zytokineffekte bedingt ist [112, 222]. Die sogenannte „EPO-“ oder „ESA-Hyporeagibilität“ (ESA: Erythropoiesis-Stimulating Agents, Erythropoese-stimulierende Substanzen) stellt das klinische Korrelat hierzu dar. Dieses häufig im Rahmen der Anämietherapie bei CKD beschriebene Phänomen ist als ungenügender Hämoglobinanstieg trotz der Gabe von Erythropoese-stimulierenden Medikamenten in adäquat hoher Dosierung definiert [7]. Ein Eisenmangel kann hierbei mitursächlich sein oder aber additiv vorliegen.

Zusammenfassend sind die führenden Pathomechanismen in der Entstehung der Anämie bei CKD: die Fehlregulation der Eisenhomöostase, respektive ein funktioneller und / oder absoluter Eisenmangel, die beeinträchtigte EPO-Produktion mit konsekutivem EPO-Mangel sowie das reduzierte Ansprechen hämatopoetischer Zellen auf endogenes oder exogenes EPO [20, 112]. Die verkürzte Lebensdauer von Erythrozyten sowie die Akkumulation urämischer Toxine, die die Erythropoese zusätzlich inhibieren, sind dabei weitere aggravierende Faktoren [17, 219, 222]. Zur Veranschaulichung sind die führenden Pathomechanismen, die an der Entstehung der Anämie bei CKD beteiligt sind, sowie deren pathophysiologische Wechselwirkungen in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

Nach der laborchemischen Diagnose einer Anämie haben die Ursachensuche sowie die konsequente Therapie derselben (besonders bei chronisch nierenkranken Menschen) eine hohe Relevanz für betroffene Patienten. Zunächst ist eine Anämie oft mit belastenden Symptomen wie Fatigue, Kopfschmerzen und Tachykardien assoziiert, wodurch die körperliche Leistungsfähigkeit beeinträchtigt und die Lebensqualität verringert werden kann [133].

Darüber hinaus erscheint eine Anämie bei chronisch nierenkranken Menschen aber besonders deshalb bedeutsam, weil eine pathophysiologische Rolle von Anämie [114, 129, 215, 221] und auch Eisenmangel [16, 44, 45, 113] in der Entstehung der hohen Mortalität und Morbidität bei Menschen mit CKD angenommen wird.



**Abbildung 1 Entstehung der Anämie bei CKD:** Inflammationsprozesse führen direkt - Zytokin-vermittelt - und indirekt - durch Induktion der Hepcidinsynthese - zu der Herabregulation von Ferroportin. Es kommt zu **A)** einer reduzierten intestinalen Eisenresorption, da der basolaterale Eisenexport gehemmt wird **B)** einer Eisenretention im RES, da die Eisenaufnahme via DMT-1 stimuliert, der Eisenexport aber gehemmt wird **C)** einer Hemmung der renalen EPO-Produktion, die durch den Verlust EPO-synthetisierender Zellen im Verlauf der CKD aggraviert wird und **D)** einem reduzierten Ansprechen hämatopoetischen Gewebes auf EPO, was durch die Abnahme der EPO-Rezeptordichte auf den Zielzellen und eine Zytokin-vermittelte Hemmung von Erythrozytenvorstufen bedingt ist. Darüber hinaus stimuliert EPO die Synthese von Erythroferron im Knochenmark; Erythroferron (ERFE) hemmt die Hepcidinsynthese und erhöht so die Verfügbarkeit von Eisen für die Erythropoese (die Hepcidinsynthese wird allgemein durch Zytokine und Eisenüberladung stimuliert; durch Eisenmangel und ERFE, respektive eine gesteigerte Erythropoeseaktivität, gehemmt). Abkürzungen: EPO (Erythropoetin), DMT-1 (divalenter Metallionentransporter 1), Fe<sup>2+/3+</sup> (2/3-wertige Eisen-Ionen), HHä (Haephaestin), HO (Hämoxygenase), TNF-α (Tumornekrose Faktor α), ??? (unbekannter Häm-Transporter).

## **3.2. Anämie, Eisenmangel und das phosphaturische Hormon Plasma-FGF-23 als kardiovaskuläre Risikofaktoren bei CKD**

Mit einer im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa zehn bis zwanzigfach erhöhten kardiovaskulären Mortalität zählen Menschen mit einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz (End Stage Renal Disease, ESRD) zu einer kardiovaskulären Hochrisikogruppe [38, 62]. Ferner ist bei chronisch nierenkranken Menschen auch die nicht-kardiovaskuläre Mortalität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht [38]. Übersichtsarbeiten resümieren, dass für einen chronisch nierenkranken Menschen eine größere Wahrscheinlichkeit besteht an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben als die terminale Niereninsuffizienz zu erreichen [164, 175]. Dabei findet sich bereits in früheren Stadien der CKD eine unabhängige Assoziation zwischen einer reduzierten GFR mit einem erhöhten Risiko für Sterblichkeit, kardiovaskuläre Ereignisse sowie Krankenhausaufnahmen [30, 70].

Neben einer im Vergleich zu nierengesunden Menschen signifikant höheren Prävalenz traditioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren wie einem Diabetes mellitus, einer arteriellen Hypertonie sowie einer Hypertriglyzeridämie [70, 132, 187], tragen auch nicht-traditionelle, CKD-spezifische Risikofaktoren zu dieser hohen Mortalität bei [175, 176]. Hierbei werden insbesondere ein dysregulierter Calcium-Phosphat-Stoffwechsel [24, 105] sowie eine Anämie [114, 129, 167] als bedeutsame Risikofaktoren diskutiert [130, 175]. Auch ein Eisenmangel scheint einen relevanten Einflussfaktor darzustellen. Während die Datenlage hierzu besonders für Menschen mit nicht dialysepflichtiger CKD lange spärlich war, wurde die prognostische Bedeutung des Eisenmangels nun in aktuellen Arbeiten dokumentiert [16, 45].

Hinsichtlich der Anämie zeigten Beobachtungsstudien bei Menschen mit CKD mehrfach eine Assoziation mit einem gehäuften Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkten [14, 33, 215], Herzinsuffizienz [zitiert nach 61, 71, 215] und linksventrikulärer Hypertrophie [111, 123, 221]. Darüber hinaus fanden verschiedene longitudinale Beobachtungsstudien eine unabhängige Assoziation zwischen Gesamtmortalität und (Eisenmangel-) Anämie bei Menschen mit CKD [91, 114, 129].

Einen weiteren zentralen CKD-spezifischen Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse stellt die Dysregulation des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels bei CKD dar. Diese CKD-assoziierte Störung des Mineral- und Knochenstoffwechsels aggraviert sich mit Progression der Nierenerkrankung zunehmend und wird als eigene Krankheitsentität auch als „Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorders“ (CKD-MBD) bezeichnet [2, 152].

Die CKD-MBD ist traditionell charakterisiert durch niedrignormales bis vermindertes Plasma-Calcium, niedriges Serum-Calcitriol (Vitamin D<sub>3</sub>), erhöhtes Plasma-Phosphat und erhöhtes Serum-Parathormon (PTH) [2, 49]. Weiterhin wurde in den letzten Jahren ein Anstieg des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23 (fibroblast growth factor 23) als zentrale Komponente der CKD-MBD erkannt [49, 83]. So wird postuliert, dass durch die abnehmende renale Filtrationskapazität bei fortschreitender CKD die Fähigkeit zur Phosphatexkretion über die Niere abnimmt, wodurch ein Anstieg des Plasma-Phosphatspiegels droht. Konsekutiv wird die Freisetzung von Plasma-FGF-23 aus Osteozyten induziert [48]. Plasma-FGF-23 entfaltet seine Wirkung durch Bindung ubiquitärer FGF-Rezeptoren [83]. Die Organspezifität der klassischen Plasma-FGF-23-Effekte entsteht dabei durch die Notwendigkeit des Ko-Rezeptors  $\alpha$ -Klotho zur Signaltransduktion, wobei  $\alpha$ -Klotho vorwiegend in der Nebenschilddrüse und den Nieren exprimiert wird [34, 201, 209]. Zu den von Plasma-FGF-23 vermittelten Wirkungen zählen die Reduktion der tubulären Phosphatrückresorption aus dem Primärharn [19] sowie die Senkung von Serum-Calcitriol durch Inhibierung der Calcitriolsynthese und Steigerung des Calcitriolabbaus [184]; auch eine Hemmung der gastrointestinalen Phosphatresorption durch Plasma-FGF-23 wird diskutiert. Insgesamt resultiert eine Senkung des Plasma-Phosphats [83].

Induktoren der Plasma-FGF-23-Produktion sind neben der Hyperphosphatämie zum einen das Serum-Calcitriol, welches die FGF-23-Expression direkt induzieren kann [127], und zum anderen mutmaßlich Serum-PTH, wobei die Datenlage hierzu noch uneindeutig ist [83, 171]. Epidemiologisch konnten in älteren Arbeiten einige Komponenten der CKD-MBD wie etwa erniedrigtes Serum-Calcidiol und erhöhtes Plasma-Phosphat als unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Mortalität bei CKD identifiziert werden [24, 172, 198]. Jüngere Publikationen weisen indes darauf hin, dass auch die Erhöhung von Plasma-FGF-23 einen eigenständigen CKD-assoziierten Risikofaktor für (kardiovaskuläre) Mortalität darstellt [94, 181]. Allerdings liegen bislang keine eindeutigen Erkenntnisse vor, weshalb Plasma-FGF-23 innerhalb dieses Patientenkollektivs ein solch starker Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse [177] sowie für die Gesamtmortalität und für das Risiko der Progression einer CKD hin zur ESRD, respektive zur Dialysepflichtigkeit, ist [94, 109]. Weiterhin implizieren verschiedene Studienergebnisse eine mögliche pathophysiologische Schlüsselrolle von Plasma-FGF-23 in der Entstehung der prognostisch ungünstigen linksventrikulären Hypertrophie des Herzens [53, 77] sowie dem Auftreten kardialer Dekompensationen besonders in Zusammenhang mit der CKD [177, 181]. Somit bleibt unklar, ob Plasma-FGF-23 tatsächlich ein kausaler Mediator in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist oder lediglich einen diagnostischen Marker darstellt, der den Einfluss anderer, eigentlich zugrundeliegender pathophysiologischer Mediatoren reflektiert.

### **3.3. Assoziation eines Eisenmangels mit erhöhtem Plasma-FGF-23 im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung**

Es konnte gezeigt werden, dass Plasma-FGF-23 schon in frühen Stadien der CKD erhöht ist, und zwar selbst dann, wenn (noch) keine Hyperphosphatämie als möglicher (patho-) physiologischer Induktor nachweisbar ist [76, 93].

Somit gilt ein Anstieg von Plasma-FGF-23 als frühester Marker der CKD-MBD-Diagnostik, da dieser bereits vor messbaren Veränderungen anderer Parameter des Mineral- und Knochenstoffwechsels wie etwa Plasma-Phosphat, Serum-PTH, Plasma-Calcium oder Serum-Calcitriol detektiert werden kann [76, 93]. Diese Beobachtung legt nahe, dass neben den „konventionellen“ Regulatoren der Plasma-FGF-23-Produktion - wie dem Serum-Calcitriol, Serum-PTH und Plasma-Phosphat - auch andere Einflussgrößen außerhalb der klassischen CKD-MBD die Plasma-FGF-23-Produktion beeinflussen können. Vor diesem Hintergrund deckten rezente Publikationen eine Interaktion der beiden nicht-traditionellen kardiovaskulären CKD-assoziierten Risikofaktoren „(Eisenmangel-) Anämie“ und „CKD-MBD“ auf [37, 230].

Bei 55 nierengesunden Frauen mit Eisenmangelanämie aufgrund uteriner Blutungen wurde eine deutliche Erhöhung von Plasma-FGF-23 gemessen, welche mit dem Ausprägungsgrad der Eisenmangelanämie korrelierte. Diese Erhöhung wurde aber nur dann beobachtet, wenn Plasma-FGF-23 mit dem sogenannten „C-terminalen FGF-23-ELISA“ bestimmt wurde, welcher biologisch aktives „intaktes“ Plasma-FGF-23 sowie dessen vermutlich biologisch inaktive „C-terminale“ Spaltprodukte nachweist. Wurde jedoch ein FGF-23 ELISA verwendet, der ausschließlich intaktes Plasma-FGF-23 nachweist, zeigten sich die Werte innerhalb des laborchemischen Referenzbereichs. Folglich kumulierte im Rahmen des Eisenmangels lediglich das biologisch inaktive, C-terminale Plasma-FGF-23, weshalb die betroffenen Frauen keine Hypophosphatämie entwickelten. Nach intravenöser Gabe von Dextran-basierten Eisenpräparaten kam es dann zu einem signifikanten Abfall des C-terminalen Plasma-FGF-23, während das intakte Plasma-FGF-23 weiterhin unverändert blieb [228].

Dies steht in Einklang mit tierexperimentellen Studien, die aufzeigten, dass ein Eisenmangel bei nierengesunden Tieren die Transkription von FGF-23-mRNA und damit die Synthese des Hormons stimulieren kann. Gleichmaßen wurde dabei aber auch die proteolytische Spaltung von Plasma-FGF-23 und damit dessen Inaktivierung induziert. Dementsprechend kam es durch den Eisenmangel zu einem selektiven Anstieg des C-terminalen Plasma-FGF-23, das intakte Plasma-FGF-23 aber blieb stets konstant und die Phosphathomöostase unbeeinträchtigt [52].

Prinzipiell kann demzufolge ein Eisenmangel, respektive eine Eisenmangelanämie, auch beim Menschen zu einer Steigerung der Plasma-FGF-23-Synthese führen, wobei die Plasma-FGF-23-Proteolyse in gleichem Maße gesteigert wird. Durch diese offenbar physiologische Kopplung von Plasma-FGF-23-Synthese und Plasma-FGF-23-Proteolyse wirken sich Veränderungen innerhalb des Eisenstoffwechsels bei gesunden Individuen nicht messbar auf den Mineral- und Knochenstoffwechsel aus. Nun wird allerdings angenommen, dass die Kopplung von Plasma-FGF-23-Synthese und -Proteolyse bei einem Eisenmangel im Rahmen der CKD beeinträchtigt sein könnte [230], ähnlich wie es bei Menschen mit einer autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis (ADHR, autosomal dominant hypophosphatemic rickets) beobachtet wird. Bei der ADHR ist die Proteolyse von Plasma-FGF-23 aufgrund von Missense-Mutationen des FGF-23-Gens gestört [224]; dementsprechend führt eine Induktion der Plasma-FGF-23-Synthese, beispielsweise durch einen Eisenmangel, bei ADHR zu einer überproportionalen Plasma-FGF-23-Erhöhung, die nicht durch eine kompensatorische Steigerung der Plasma-FGF-23-Proteolyse korrigiert werden kann [52, 230]. Die Tatsache, dass es mittlerweile im Tiermodell Hinweise darauf gibt, dass die Plasma-FGF-23-Proteolyse auch bei CKD-assoziiertem Eisenmangel beeinträchtigt zu sein scheint, stützt diese Hypothese [37].

Da durch einen Eisenmangel die Plasma-FGF-23-Synthese gesteigert wird, wäre bei gleichzeitig eingeschränkter Plasma-FGF-23-Proteolyse bei Menschen mit CKD eine deutliche Erhöhung von Plasma-FGF-23 die Folge. Darüber hinaus wurde der Eisenmangel als eine häufige Begleiterscheinung der CKD, dessen Prävalenz mit Voranschreiten der CKD zunimmt [55], bereits mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [16, 45, 113]. Bei Patienten in fortgeschrittenen CKD-Stadien wurden schon 100-fach höhere Plasma-FGF-23-Spiegel im Vergleich zu nierengesunden Menschen gemessen [120]. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass der Eisenmangel die eigentliche Ursache der hohen Mortalität bei CKD-Patienten mit erhöhtem Plasma-FGF-23 ist.

In Einklang wurde auch in klinischen Studien bei Patienten mit einer CKD in den Stadien 3-4 eine negative Korrelation zwischen einer niedrigen Hämoglobinkonzentration, respektive einer (Eisenmangel-) Anämie, und erhöhtem Plasma-FGF-23 gefunden [202]. Dies stützt ebenfalls die Annahme einer klinisch relevanten Wechselwirkung zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und einem Eisenmangel beziehungsweise einer Eisenmangelanämie *in vivo*.

### **3.4. Ist die Hypoferritinämie der pathophysiologisch relevante Mediator des Zusammenhangs zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und gesteigerter renaler und kardiovaskulärer Mortalität bei chronischer Nierenerkrankung?**

Vor dem erläuterten pathophysiologischen Hintergrund wird im Folgenden von der Annahme ausgegangen, dass die experimentell und klinisch beobachtete Interaktion zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und einem Eisenmangel die Assoziation von erhöhtem Plasma-FGF-23 mit renalen und kardiovaskulären Ereignissen erklärt. Weiter wird angenommen, dass Plasma-FGF-23 keinen eigenständigen, pathophysiologisch relevanten renalen und / oder kardiovaskulären Risikofaktor darstellt, sondern dass erhöhtes Plasma-FGF-23 lediglich den Einfluss anderer, eigentlicher zugrundeliegender Mediatoren, insbesondere den eines Eisenmangels, widerspiegelt. Ältere epidemiologische Arbeiten haben in Analysen zur Bedeutung von Plasma-FGF-23 zumeist nicht für Parameter des Eisenstatus statistisch korrigiert, sodass diese Interaktion übersehen worden sein könnte.

Es werden daher folgende, zu prüfende Hypothesen aufgestellt:

- I. Wie bei nierengesunden Menschen ist auch bei Menschen mit CKD eine Hypoferritinämie als labordiagnostischer Indikator eines Eisenmangels mit erhöhtem Plasma-FGF-23 assoziiert.
- II. Die epidemiologische Assoziation zwischen Plasma-FGF-23 und kardiovaskulären sowie renalen Ereignissen wird nach Korrektur für Plasma-Ferritin abgeschwächt.

Falls diese Hypothesen bestätigt werden, wäre der Eisenmangel - wahrscheinlicher als eine direkte Wirkung von Plasma-FGF-23 - pathophysiologischer Mediator der Assoziation von Plasma-FGF-23 mit renalen und kardiovaskulären Ereignissen.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. CARE for HOME Studie**

#### **4.1.1. Studiendesign**

In den Jahren 2008 bis 2015 wurden im Rahmen der CARE for HOME Studie (Cardiovascular and Renal Outcome in CKD 2-4 Patients - The Fourth Homburg evaluation) der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten - des Universitätsklinikums des Saarlandes 544 Patienten mit CKD („chronic kidney disease“; chronische Nierenerkrankung) in den Stadien 2-4 nach K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) rekrutiert.

Die Rekrutierung der Patienten war hierbei Gegenstand verschiedener eigenständiger Promotionsarbeiten [59, 84, 220] und beinhaltete die anamnestische Erfassung von Komorbiditäten und kardiovaskulärem Risikoprofil der eingeschlossenen Patienten mittels standardisierter Fragebögen, die sonographische Untersuchung von Abdomen, Nieren, Herz und Arteriae carotides sowie eine umfangreiche Labordiagnostik von Blut- und Urinproben.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes überprüft und genehmigt. Alle Patienten willigten schriftlich in die Studienteilnahme und die Durchführung von jährlichen Nachuntersuchungen ein. Die Nachuntersuchungen dienten dabei insbesondere der Erfassung zwischenzeitlich stattgefundenener kardiovaskulärer Ereignisse sowie der Erfassung von Parametern einer klinischen oder laborchemischen Progression der CKD. Der Nachbeobachtungszeitraum war auf fünf Jahre begrenzt.

#### **4.1.2. Einschlusskriterien**

In die CARE for HOME Studie wurden Patienten eingeschlossen, die sich regelmäßig in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin IV vorstellten. Die Voraussetzung für die Studienteilnahme war das Vorliegen einer CKD in den Stadien 2-4 nach K/DOQI entsprechend einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate („estimated glomerular filtration rate“; eGFR) von 15 - 89 ml / min /1,73 m<sup>2</sup> sowie ein Alter über 18 Jahren.

Die für die Stadieneinteilung notwendige Quantifizierung der exokrinen Nierenfunktion erfolgte mit Hilfe der MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease Study Equation).

Die MDRD-Formel berücksichtigt bei der Errechnung der eGFR neben dem standardisierten Serum-Kreatinin auch das Geschlecht, das Alter und die Ethnizität eines Patienten:

**MDRD Study Equation (MDRD Schätzformel\*)**

$$eGFR = 175 \times (S_{Cr})^{-1.154} \times (age)^{-0.203} \times 0.742 \text{ [if female]} \times 1.212 \text{ [if Black]}$$

**Abbreviations, Units (Abkürzungen, Einheiten\*):**

**eGFR** (estimated glomerular filtration rate) = ml / min / 1.73 m<sup>2</sup>

**S<sub>cr</sub>** (standardized serum creatinine) = mg / dl

**Age** = years (Alter in Jahren)

**if female**, wenn weiblichen Geschlechts → Multiplikation mit 0,742

**if Black**, bei schwarzer Hautfarbe → Multiplikation mit 1,212

\*<https://www.kidney.org/content/mdrd-study-equation>

**Tabelle 1** Stadieneinteilung der CKD anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) modifiziert nach den K/DOQI-Leitlinien aus dem Jahr 2002 [157]

| CKD-Stadium | GFR [ml / min / 1.73 m <sup>2</sup> ] | Kurzbeschreibung  |
|-------------|---------------------------------------|---|
| <b>1</b>    | ≥ 90                                  | Normale GFR oder GFR ↑ +<br>Nachweis eines Nierenschadens |
| <b>2</b>    | 89 – 60                               | Leicht reduzierte GFR +<br>Nachweis eines Nierenschadens  |
| <b>3a</b>   | 59 – 45                               | Leicht - mäßig eingeschränkte<br>GFR                      |
| <b>3b</b>   | 44 – 30                               | Mäßig - schwer eingeschränkte<br>GFR                      |
| <b>4</b>    | 29 – 15                               | Schwer eingeschränkte GFR                                 |
| <b>5</b>    | < 15 oder Dialyse                     | ESRD / Nierenversagen                                     |

Die CKD wird definiert als Reduktion der GFR < 60 ml / min / 1.73 m<sup>2</sup> und / oder als Nachweis eines chronischen Nierenschadens, von welchen beide jeweils mehr als 3 Monate persistieren müssen. Ein solcher Nierenschaden ist definiert als pathologische Abnormität der Nieren oder Zeichen einer Nierenschädigung in der Histologie und / oder der klinischen Bildgebung sowie renal-bedingte pathologische Veränderung von Blut- oder Urinwerten. Die Stadieneinteilung der CKD nach K/DOQI aus dem Jahr 2002 wurde später um die weitere Unterteilung des Stadiums 3 in die Stadien 3 a und 3 b sowie die Quantifizierung einer begleitenden Proteinurie (Albuminurie) erweitert, um eine bessere Risikostratifizierung der Patienten zu erreichen [4].

Entsprechend der K/DOQI-Leitlinien wurden die Patienten, deren eGFR zwischen 60 und 89 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup> lag, nur dann in die CARE for HOME Studie eingeschlossen, wenn der Nachweis eines strukturellen und / oder funktionellen Nierenschadens erbracht werden konnte. Wir definierten einen solchen Nierenschaden als eine mittels Nierenbiopsie gesicherte Nephropathie und / oder Tubulopathie, eine hereditäre Nierenerkrankung, eine persistierende glomeruläre Hämaturie, eine Proteinurie (> 300 mg / g), eine Albuminurie (> 17 mg / g [bei Männern], > 25 mg / g [bei Frauen]) einen erhöhten Cystatin C-Wert (> 1,05 mg / l) und / oder einen erhöhten Kreatinin-Wert (> 1,2 mg / dl [bei Männern], > 0,9 mg / dl [bei Frauen]).

#### **4.1.3. Ausschlusskriterien**

Zu Studienbeginn führten folgende Kriterien zum Studienausschluss:

- 1) das Vorliegen einer aktiven onkologischen oder hämatologischen Grunderkrankung
- 2) das Vorliegen einer HIV-Infektion
- 3) die Einnahme einer medikamentösen, systemischen Immunsuppression
- 4) das Vorliegen einer akuten systemischen Entzündungsreaktion, definiert als fieberhaft verlaufender und / oder antibiotikapflichtiger Infekt oder als asymptomatische CRP-Erhöhung > 50 mg / l
- 5) ein akutes Nierenversagen, definiert als Anstieg des Kreatininwerts über mehr als das 1,5-fache innerhalb von vier Wochen vor Studieneinschluss
- 6) das Vorliegen einer CKD in den K/DOQI Stadien 1 (eGFR > 90 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup>) oder 5 (eGFR < 15 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup>) oder eine stattgehabte Nierentransplantation

#### **4.1.4. Besondere Patientencharakteristika und Studienendpunkte**

Das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten wurde folgendermaßen charakterisiert:

- Diabetes mellitus: bestehender ärztlich vordiagnostizierter Diabetes mellitus und / oder Therapie mit oralen Antidiabetika und / oder Therapie mit Insulin und / oder ein Nüchtern-Blutzucker von > 126 mg / dl
- Nikotinabusus: Rauchen von mindestens einer Zigarette in den letzten 4 Wochen
- Positive Familienanamnese: Auftreten eines Myokardinfarktes und / oder ischämischen Schlaganfalls bei Verwandten 1. Grades vor Erreichen des 65. Lebensjahrs

Kardiovaskuläre Ereignisse waren definiert als:

- Koronararterielle Intervention (perkutane transluminale koronare Angioplastie / PTCA oder Stentimplantation) und / oder Bypassoperation am Herzen
- Periphere arterielle Intervention (perkutane transluminale Angioplastie / PTA oder Stentimplantation), peripher-arterielle Bypassoperation, Gefäßplastik und / oder Gefäßprothesenimplantation
- Nicht-traumatische Amputationen proximal des Sprunggelenkes
- Zerebrovaskuläre Intervention (zerebrovaskuläre Revaskularisierung, Implantation eines Stents und / oder Thrombendarterektomie der Carotiden)
- Erleiden eines Apoplex, definiert als schnell progrediente Symptomatik mit Anzeichen einer fokalen beziehungsweise teils globalen Hirnfunktionsstörung, die nicht durch anderweitige neurologische Erkrankungen bedingt ist und über > 24 Stunden anhält
- Erleiden eines akuten Myokardinfarkts - für die Definition aller hierunter fallenden Befundkonstellationen kardialer Marker und EKG-Veränderungen wird auf die Publikation von *Thygesen et al.* von 2012 verwiesen [200]

Alle anamnestisch erhobenen Angaben der Patienten wurden mittels Krankenblattstudiums über die Datenbank des Universitätsklinikums des Saarlandes oder durch Anforderung von Dokumenten und Arztbriefen externer Kliniken überprüft und validiert.

Vor diesem Hintergrund definierten sich die Endpunkte der Studie wie folgt:

- Kombiniertes primäres kardiovaskuläres Endpunkt: jegliches kardiovaskuläres Ereignis und / oder Tod jedweder Genese
- Kombiniertes primäres renales Endpunkt: Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit bei terminaler Nierenerkrankung („end stage renal disease“, ESRD) für mindestens 3 Monate und / oder Tod jedweder Genese
- Sekundäres kardiovaskuläres Endpunkt: akuter Myokardinfarkt, ischämischer Apoplex und / oder Tod kardiovaskulärer Genese
- Sekundäres renales Endpunkt: Halbierung der eGFR und / oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit bei ESRD für mindestens 3 Monate

## 4.2. Ablauf der jährlichen Nachuntersuchung

Im Kontext der jährlichen Nachuntersuchung (Follow Up) wurden alle Patienten wenige Tage vor dieser Untersuchung telefonisch an den Termin und die Einhaltung der Nüchternheit erinnert (entsprechend einer Nahrungskarenz von mindestens acht Stunden). Patienten, die den Termin aufgrund einer Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes oder eines Wohnortwechsels nicht wahrnehmen konnten, wurden zum Zeitpunkt der Fälligkeit der jährlichen Nachuntersuchung telefonisch kontaktiert und mittels eines standardisierten Fragebogens zu ihrer gesundheitlichen Verfassung und etwaigen stattgehabten studienrelevanten Ereignissen befragt. War ein persönliches Gespräch mit den Patienten selbst nicht möglich, wurden die Informationen fremdanamnestisch durch Angehörige und / oder den betreuenden Hausarzt eingeholt. Analog erfolgte die Nachbeobachtung der Patienten, die während der Studienteilnahme dialysepflichtig wurden und damit nicht mehr in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin IV angebunden waren. Hierbei erfolgte zusätzlich eine telefonische Rücksprache mit deren betreuenden Nephrologen.

Im Regelfall konnten die Patienten jedoch persönlich erscheinen, wobei sie am Tag der Nachuntersuchung in der nephrologischen Ambulanz aufgenommen und zunächst zur Abgabe eines Spontanurins aufgefordert wurden. Im Anschluss wurde allen Patienten nach 5-minütigem Sitzen aus einer oberflächlichen Armvene Blut entnommen, aus welchem später etablierte Routineparameter unter standardisierten Bedingungen durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes bestimmt wurden. Detaillierte Informationen zu den für diese Dissertationsschrift relevanten Laboruntersuchungen sind unter 4.4. und 4.5. dargestellt.

Für die Anamnese und klinische Untersuchung wurden die Patienten in ein separates Zimmer gebeten. Dort wurden im Patientengespräch der aktuelle Gesundheitszustand und das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten anhand eines standardisierten Fragebogens erfasst. Das Fragebogeninterview beinhaltete neben der Alkohol- und Nikotinanamnese, der Medikamentenanamnese und der Abfrage der körperlichen Aktivität auch die Evaluation von Vorerkrankungen und aktuellen Beschwerden - insbesondere im Hinblick auf pektanginöse und pAVK-typische (periphere arterielle Verschlusskrankheit) Symptomatik. Zudem wurden stationäre Krankenhausaufenthalte in den zwei vorangegangenen Jahren, besonders auf Grund von kardiovaskulären Ereignissen, akuter Verschlechterung der Nierenfunktion und / oder kardialer Dekompensationen erfragt.

Nach mindestens 10-minütigem Sitzen wurde bei allen Patienten eine Blutdruckmessung an beiden Armen durchgeführt. Anschließend erfolgte an dem Arm mit dem höher gemessenen Blutdruckwert eine insgesamt 10 Minuten andauernde automatische Blutdruckmessung in Einzelintervallen mit einminütigem Abstand mit jeweils demselben geeichten, elektronischen Blutdruckmessgerät (Dinamap V 100, Anandic medical systems AG/SA, Diessenhofen, Schweiz). Hierzu verließ der Untersucher vorübergehend den Raum. Hiernach wurde bei jedem Patienten im Liegen ein Ruhe-EKG geschrieben.

Zur Erfassung anthropometrischer Daten wurde das Körpergewicht der Patienten durch eine digitale, geeichte Waage ermittelt und deren Körpermitte mittels eines geeichten Maßbandes an der Taille (während der Ausatmung mittig auf Höhe der Verbindungslinie zwischen der Crista iliaca und dem Unterrand der 12. Rippe), am rechten Oberarm (mittig zwischen dem Olecranon und dem tastbaren Caput humeri) sowie an der Hüfte (Messung auf der Höhe der Trochanter majoris) gemessen. Hieraus kann zur Abschätzung der Körperfettverteilung der Taille-Hüft-Quotient (Waist-to-Hip-Ratio, WHR) errechnet werden:

$$\text{WHR} = \text{Tailenumfang [cm]} / \text{Hüftumfang [cm]}$$

Der Körpermasseindex (Body-Mass-Index, BMI) wurde durch die folgende Formel bestimmt:

$$\text{BMI [kg / m}^2\text{]} = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2$$

Befanden sich die Patienten im fünften Nachuntersuchungsjahr, wurde neben einer Sonographie des Abdomens mit Fokus auf Nieren (Größe, Anatomie, Widerstandsindices, Ausschluss einer Nierenarterienstenose, Ausschluss von Tumoren) und Milz (Größe, Widerstandsindices, Tumorausschluss) auch eine Echokardiographie und Gefäßsonographie durchgeführt. Bei allen Untersuchungen kam dasselbe Sonographiegerät (Sequoia 512 Gerät; Thousand Oaks, Kalifornien, USA) zur Anwendung.

Die Erfassung des kardiovaskulären Risikoprofils, die Abfrage von Informationen über Krankenhausaufenthalte und studienrelevante (kardiovaskuläre und renale) Ereignisse fand im Patienteninterview statt. Alle anamnestischen Angaben wurden mittels Durchsicht intern vorliegender Krankenakten, Anforderung externer Arztbriefe und Entlassungsdokumente und mittels Zuhilfenahme des Universitätsinternen SAP<sup>®</sup>-Systems durch zwei Ärzte der Klinik für Innere Medizin IV unabhängig voneinander verifiziert und validiert.

Innerhalb des Zeitraumes vom 13.10.2014 bis zum 02.10.2015 waren die jährlichen Nachuntersuchungen der CARE for HOME Studienteilnehmer Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit und wurden durch die Verfasserin der Dissertationsschrift durchgeführt.

#### 4.2.1 Labordiagnostik bei der jährlichen Nachuntersuchung

Im Rahmen der jährlichen Nachuntersuchung wurde allen Patienten nach 5-minütigem Sitzen venöses Vollblut entnommen; dieses wurde verpackt und umgehend mittels Rohrpost in das Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) versendet. Dort erfolgte nach standardisierter Methodik die Bestimmung von etablierten Routinelaborparametern wie Elektrolyten (hierunter auch Calcium und Phosphat), Cholesterin, Triglyzeriden, Kreatinin und C-reaktivem Protein (CRP) aus einem 4,7 ml Lithium-Heparin-Röhrchen, aus einem 2,7 ml EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Röhrchen erfolgte die Anfertigung eines großen Blutbildes, aus einem 5 ml Citrat-Röhrchen wurden die Gerinnungsparameter sowie aus einem 4,7 ml Serum-Röhrchen verschiedene Parameter des Mineral- und Knochenstoffwechsels wie etwa das Parathormon und das 25-Hydroxy-Vitamin-D bestimmt.

([http://www.uniklinikum-saarland.de/einrichtungen/kliniken\\_institute/zentrallabor/analysenspektrum\\_referenzwerte/](http://www.uniklinikum-saarland.de/einrichtungen/kliniken_institute/zentrallabor/analysenspektrum_referenzwerte/))

Unter den Routinelaborparametern hatte insbesondere Plasma-Ferritin als zentraler Parameter des Eisenstatus für die Auswertungen der vorgelegten Promotionsarbeit hohe Relevanz. Plasma-Ferritin wurde aus einem Lithium-Heparin-Röhrchen durch das Zentrallabor des UKS bestimmt. Hierfür wurde ein **Elektrochemilumineszenz Immunoassay** „**ECLIA**“ (Cobas System, Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) verwendet, ein immunologischer *in vitro* Test zur quantitativen Bestimmung von Ferritin in humanem Blutserum oder Blutplasma. Das Testprinzip des „**ECLIA**“ entspricht dem eines Sandwich-Immunoassays, für welchen zwei monoklonale Mausantikörper eingesetzt wurden.

([http://zentrallaborweb.uniklinikum-saarland.de/labor/data/Beipackzettel/COBAS/FERPI/Ferritin\\_202008\\_V12.pdf](http://zentrallaborweb.uniklinikum-saarland.de/labor/data/Beipackzettel/COBAS/FERPI/Ferritin_202008_V12.pdf))

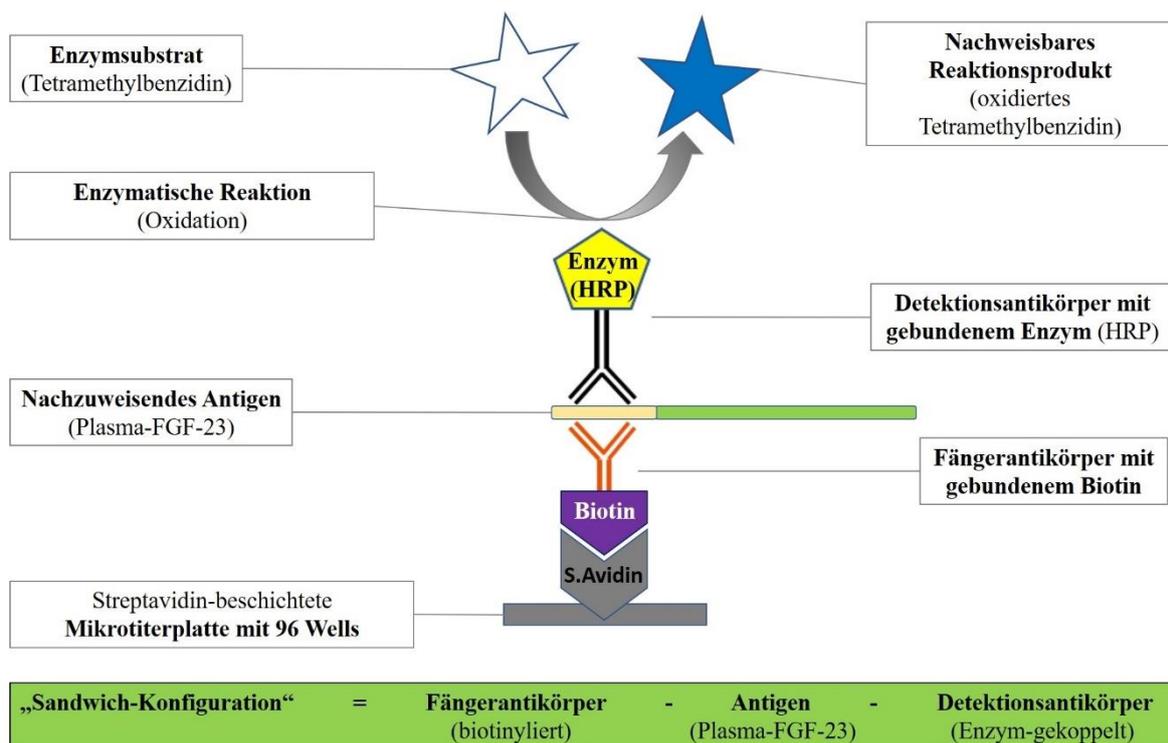
Ein Teil der abgenommenen Blutproben, respektive ein 9 ml EDTA-Röhrchen, ein 9 ml Serum-Röhrchen sowie ein 2,7 ml EDTA-Röhrchen, wurden nicht an das Zentrallabor des UKS, sondern an das hausinterne nephrologische Labor gegeben und dort weiter aufbereitet. Hier wurden Serum- und Plasmaproben sowie ein geringer Anteil Vollblut asserviert und bei - 80° C tiefgefroren. Aus diesen Proben wurden später verschiedene Biomarker wie auch das phosphaturische Hormon Plasma-FGF-23 (fibroblast growth factor 23) bestimmt.

Die Diagnostik der jährlichen Nachuntersuchung beinhaltete weiterhin die Abgabe eines Spontanurins (Mittelstrahlurin). Aus einer 10 ml Urin-Monovette wurden mitunter folgende Parameter bestimmt: Urinstatus, Urinsediment, Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Phosphor, Albumin, Kreatinin und Eiweiß. Für nachträgliche Analysen wurden einige Milliliter des Spontanurins separat abgefüllt und bei - 80 °C tiefgefroren.

## 4.3. Bestimmung des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23

### 4.3.1. Testprinzip der Plasma-FGF-23-Nachweisverfahren

Zur Messung von Plasma-FGF-23 waren zu Studienbeginn zwei Test Kits kommerziell verfügbar. Beide wiesen als Antikörper-basierte Nachweisverfahren mit Hilfe der Sandwich-ELISA-Methode (ELISA; Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) FGF-23 in Blutplasma und Zellkulturmedien nach. Hierfür werden je zwei verschiedene Antikörper verwendet, welche Plasma-FGF-23 spezifisch an unterschiedlichen Epitopen binden. Einer der Antikörper dient dazu, Plasma-FGF-23 an das Inkubationsgefäß zu fixieren (Fängerantikörper), der andere Antikörper soll mittels eines an ihn gebundenen Enzyms Plasma-FGF-23 nachweisbar machen (Detektionsantikörper). **Abbildung 2** stellt das Grundprinzip der Sandwich-ELISA-Methode anhand des für diese Arbeit verwendeten Assays schematisch dar.



**Abbildung 2 Grundprinzip der Sandwich-ELISA-Methode:** Plasma-FGF-23 wird durch einen biotinylierten Fängerantikörper an das Inkubationsgefäß, in diesem Fall an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 „Wells“ („Kavität / Vertiefung“), gebunden, indem Streptavidin mit Biotin eine feste Bindung eingeht. Zudem wird Plasma-FGF-23 an einem anderen Epitop durch den Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper gebunden. Das hier gebundene Enzym HRP kann nach Zusatz von Wasserstoffperoxid das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin oxidieren und somit einen Farbumschlag induzieren, der photometrisch gemessen werden kann. Abkürzungen: S.Avidin (Streptavidin), HRP (Horseradish-Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase).



#### **4.3.2. Durchführung des im Rahmen der CARE for HOME Studie verwendeten Nachweisverfahrens**

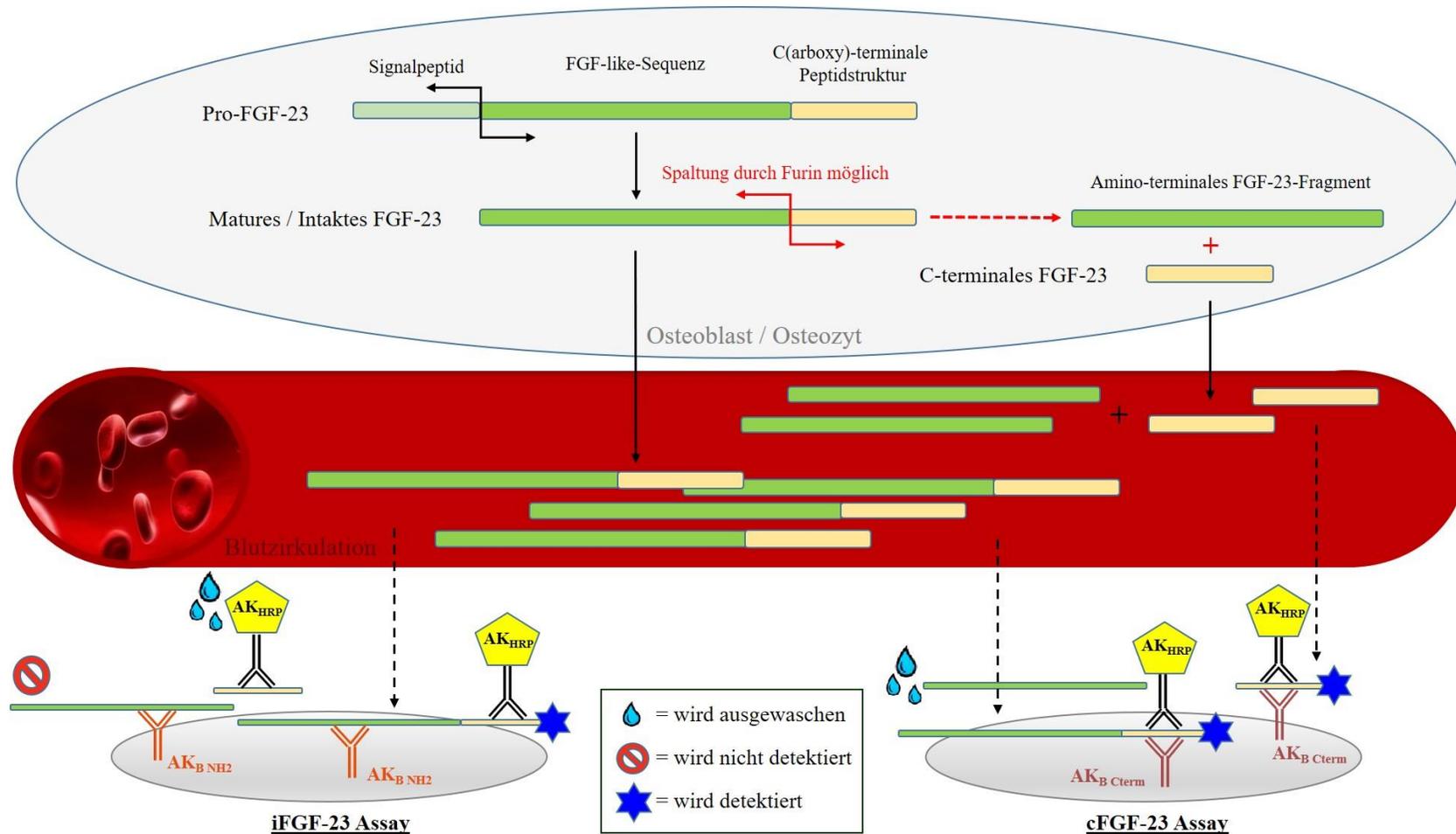
Die Bestimmung von Plasma-FGF-23 erfolgte aus Blutplasmaproben, die zuvor zentrifugiert und bei - 80° C tiefgefroren worden waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der C-terminale FGF-23-ELISA der zweiten Generation von Immutopics® (San Clemente, CA, USA, unterer Grenzwert 1,5 RU / ml, oberer Grenzwert ohne Verdünnung 1500 RU / ml)<sup>2</sup> verwendet.

Zu Beginn der Messungen wurde die Mikrotiterplatte mit Streptavidin-beschichteten Streifen ausgelegt. Danach wurde das Probenmaterial (Plasmaproben der Patienten, Kontrollseren, Standardreihen) in die „Wells“ der Mikrotiterplatte pipettiert. Eine Antikörperlösung, die zu gleichen Teilen den polyklonalen, biotinylierten Antikörper und den polyklonalen HRP-gekoppelten Antikörper gegen den C-Terminus von Plasma-FGF-23 enthielt, wurde hergestellt und ebenfalls in die Wells pipettiert. Nach einer 3-stündigen Inkubationszeit wurden durch mehrfache Waschvorgänge noch ungebundene Komponenten entfernt. Anschließend wurde das Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, welches ein Substrat der HRP ist. TMB wird durch die HRP unter Zugabe von Wasserstoffperoxid zu einem bläulichem Reaktionsprodukt oxidiert und induziert so einen photometrisch messbaren Farbumschlag [102]. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen die 0 RU / ml Standards abgelesen (Photometer: Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Nachfolgend wurde in die „Wells“ ELISA-Stopp-Lösung (Schwefelsäure) zugegeben, wodurch erneut ein Farbumschlag induziert wurde. Wieder wurde die Extinktion gemessen - nun bei 450 nm. Die Extinktion wurde jeweils im Wellenlängenbereich der maximalen spezifischen Extinktion (substanzspezifisch für das verwendete Test Kit bei 450 nm und bei 595 bis 650 nm) gemessen.

Da die Menge des gebundenen Enzyms HRP mit der Menge an umgesetztem TMB und somit mit der Intensität des Farbumschlags korreliert, konnte durch die Messung der optischen Extinktion die Menge an Antikörper-gebundenem Plasma-FGF-23 und dementsprechend die Plasma-FGF-23-Konzentration in den Blutproben der Studienteilnehmer ermittelt werden. Hierzu wurden mithilfe der zugehörigen Software Magellan™ (Tecan Group Ltd.) aus den Absorptionswerten der Standardlösungen zwei Standardkurven abgeleitet, aus welchen dann die Plasma-FGF-23-Konzentration der Patientenproben direkt abgelesen werden konnte. Diese wurden regelhaft aus der primären Standardkurve für 450 nm abgelesen; hohe Werte zwischen dem fünften und sechsten Standard wurden aus der Standardkurve für 595 nm abgeleitet.

---

<sup>2</sup> Die Messung von Plasma-FGF-23 erfolgte in der arbiträren, nicht absoluten Einheit „RU“ („relative Units“) / ml.



**Abbildung 4 Messmethodik:** Das Prohormon Pro-FGF-23 besteht aus einem Signalpeptid, einer „FGF-like-Sequenz“ und einem C(arboxy)-terminalen Teil. Die Abspaltung des Signalpeptids ermöglicht eine Sekretion in die Blutbahn, dort ist es als intaktes Plasma-FGF-23 messbar. Die FGF-23-Synthese kann intrazellulär mit einer proteolytischen Spaltung durch das Enzym Furin gekoppelt werden; es entstehen Amino-terminale FGF-23-Fragmente und C-terminales FGF-23, welche auch in das Blut sezerniert werden können. Der iFGF-23 Assay (**links**) misst selektiv intaktes Plasma-FGF-23; der cFGF-23 Assay (**rechts**) erkennt sowohl intaktes als auch C-terminales Plasma-FGF-23. Abkürzungen: AK<sub>HRP</sub> (HRP-gekoppelter Antikörper), AK<sub>B</sub> cterm (biotinylierter Antikörper mit C-terminalem Epitop), AK<sub>B</sub> NH<sub>2</sub> (biotinylierter Antikörper mit Amino-terminalem Epitop) [233, 230].

## 4.4. Statistik und Datenerfassung

Mittels Microsoft® Excel wurden die erhobenen Daten elektronisch erfasst und anschließend durch das Programm SPSS (Statistical Product and Service Solutions, PASW Statistics 18, Inc; Chicago; Illinois, USA), eine Statistik- und Analyse-Software, ausgewertet.

Kategoriale Variablen werden als Anzahl (Prozent), stetige Variablen im Falle einer Normalverteilung (NV) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen oder bei nicht gegebener NV als Median (25. Perzentile; 75. Perzentile beziehungsweise Interquartilsabstand / interquartile range / IQR) angegeben. Bei den angeführten Korrelationskoeffizienten zwischen stetigen Merkmalen handelt es sich um Rangkorrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau. Bei kategorialen Variablen erfolgte der statistische Vergleich voneinander unabhängiger Stichproben mittels des  $\chi^2$ -Test. Zum Vergleich stetiger Merkmale bei mehr als zwei Stichproben wurde eine einfaktorische ANOVA mit Test auf einen linearen Trend verwendet. Im Falle fehlender Voraussetzungen für die Durchführung einer klassischen einfaktorischen ANOVA wurde der non-parametrische Kruskal-Wallis Test angewandt.

Die Überlebenszeitanalysen wurden mittels des Kaplan-Meier-Verfahrens durchgeführt. Hierzu erfolgte zunächst eine Stratifizierung des Patientenkollektivs in Tertile hinsichtlich des Plasma-FGF-23 und des Plasma-Ferritins. Hieraufhin wurde der Einfluss beider Parameter auf das ereignisfreie Überleben bezüglich vordefinierter kardiovaskulärer und renaler Endpunkte untersucht. Nach Stratifizierung der Patienten in Tertile anhand ihres Plasma-Ferritins wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse durchgeführt, in welcher nur diejenigen Patienten berücksichtigt wurden, die bei Studieneinschluss ein CRP (C-reaktives Protein)  $< 5 \text{ mg/l}$  aufwiesen. Zum deskriptiven Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen dienten die Kaplan-Meier-Kurven, der statistische Vergleich erfolgte mittels Log-rank-Testung.

Zuletzt wurde mittels uni- und multivariater Cox-Regressionsanalyse die Bedeutung von Plasma-FGF-23 einerseits sowie Plasma-Ferritin andererseits jeweils für den vordefinierten kombinierten primären kardiovaskulären Studienendpunkt und für den vordefinierten kombinierten primären renalen Studienendpunkt nach Korrektur für Störvariablen, respektive für die eGFR und für traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren, untersucht.

Als statistisch signifikant gelten in allen statistischen Verfahren p-Werte von  $\leq 0,05$ .

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Baselinecharakteristika

**Tabelle 2** zeigt die Baselinecharakteristika der 541 in die Auswertung eingeschlossenen Patienten der CARE for HOME Studie.

Hierbei waren 41% der Teilnehmer weiblich. Im Durchschnitt waren die Patienten  $65 \pm 12$  Jahre alt, hatten einen BMI von  $30,4 \pm 5,5$  kg / m<sup>2</sup>, einen systolischen Blutdruck von  $152 \pm 24$  mmHg und wiesen eine eGFR von  $46 \pm 16$  ml / min / 1,73 m<sup>2</sup> auf. Weiterhin waren 11 % der Teilnehmer zu Studieneinschluss aktive Raucher, 38% der Patienten litten an einem Diabetes mellitus.

Die mittlere Hämoglobinkonzentration der Patienten lag bei  $13,5 \pm 1,6$  g / dl und das mediane Plasma-Ferritin lag bei 147 (86; 263) ng / ml.

Insgesamt wiesen 31% der Patienten prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen auf. Im Einzelnen konnten bei 22% der Patienten koronararterielle Vorerkrankungen, bei 10% zerebrovaskuläre Vorerkrankungen und bei 7% peripher-arterielle Vorerkrankungen dokumentiert werden.

**Tabelle 2** zeigt im rechten Tabellenanteil die Baselinecharakteristika nach Stratifizierung in Tertile hinsichtlich des Plasma-Ferritins der Studienteilnehmer. Patienten in der niedrigsten Ferritin-Tertile (1. Tertile) waren häufiger weiblich, hatten einen niedrigeren Hämoglobinwert, wiesen niedrigere Plasma-Triglyzeride auf und hatten niedrigere diastolische Blutdruckwerte, sie wiesen außerdem ein deutlich erhöhtes Plasma-FGF-23 auf.

Bezüglich des Plasma-Phosphates, der fraktionellen Phosphatexkretion und der eGFR zeigten sich keine stringenten Unterschiede zwischen den einzelnen Ferritin-Tertilen.

**Tabelle 2** Baselinecharakteristika der Patienten der CARE for HOME Studie als Gesamtkohorte und nach Stratifizierung in Tertile hinsichtlich ihres Plasma-Ferritins.

|  | <b>Gesamt<br/>(541)</b> | <b>1. Tertile<br/>(181)</b> | <b>2. Tertile<br/>(180)</b> | <b>3. Tertile<br/>(180)</b> | <b>p</b> |
|--|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| Plasma-Ferritin<br>(ng / ml)                     | 147 (86; 263)           | 63 (35; 86)                 | 148 (128; 178)              | 345 (263; 485)              | < 0,001  |
| Alter (Jahre)                                    | 65 ± 12                 | 66 ± 12                     | 66 ± 12                     | 64 ± 12                     | 0,080    |
| Frauen (%)                                       | 222 (41)                | 111 (61)                    | 78 (43)                     | 33 (18)                     | <0,001   |
| BMI (kg / m <sup>2</sup> )                       | 30,4 ± 5,5              | 29,4 ± 5,4                  | 31,3 ± 6,0                  | 30,6 ± 5,0                  | 0,034    |
| BD <sub>MAD</sub> (mmHg)                         | 108 ± 14                | 106 ± 14                    | 108 ± 15                    | 109 ± 15                    | 0,104    |
| BD <sub>sys</sub> (mmHg)                         | 152 ± 24                | 151 ± 25                    | 153 ± 23                    | 153 ± 24                    | 0,504    |
| BD <sub>dias</sub> (mmHg)                        | 85 ± 13                 | 84 ± 12                     | 85 ± 13                     | 87 ± 13                     | 0,030    |
| eGFR (MDRD)<br>(ml / min / 1,73 m <sup>2</sup> ) | 46 ± 16                 | 46 ± 16                     | 46 ± 15                     | 47 ± 17                     | 0,322    |
| Raucher (%)                                      | 57 (11)                 | 25 (14)                     | 20 (11)                     | 12 (7)                      | 0,083    |
| Familiäre<br>Prädisposition                      | 106 (20)                | 33 (18)                     | 31 (17)                     | 42 (23)                     | 0,293    |
| Diabetes mellitus (%)                            | 207 (38)                | 68 (38)                     | 61 (34)                     | 78 (43)                     | 0,178    |
| Albuminurie (mg / g)                             | 32 (8; 193)             | 27 (7; 192)                 | 31 (7; 175)                 | 37 (8; 203)                 | 0,540    |
| Cholesterin (mg / dl)                            | 192 ± 43                | 188 ± 37                    | 196 ± 45                    | 191 ± 46                    | 0,416    |
| Triglyzeride (mg / dl)                           | 135 (97; 190)           | 120 (93; 162)               | 128 (93; 195)               | 152 (109; 219)              | <0,001   |
| LDL-Cholesterin<br>(mg / dl)                     | 115 ± 37                | 110 ± 32                    | 118 ± 37                    | 116 ± 39                    | 0,151    |
| CRP (mg / l)                                     | 2,7 (1,1; 5,1)          | 2,6 (1,0; 5,4)              | 2,7 (1,1; 4,4)              | 2,7 (1,2; 5,4)              | 0,793    |
| Hämoglobin (g / dl)                              | 13,5 ± 1,6              | 13,2 ± 1,6                  | 13,6 ± 1,5                  | 13,7 ± 1,7                  | 0,001    |

|  |              |               |              |              |         |
|--|--------------|---------------|--------------|--------------|---------|
| Plasma-FGF-23<br>(RU / ml)                 | 99 (64; 157) | 111 (72; 189) | 99 (68; 148) | 79 (57; 136) | < 0,001 |
| Plasma-Phosphat<br>(mg / dl)               | 3,4 ± 0,7    | 3,4 ± 0,6     | 3,4 ± 0,8    | 3,3 ± 0,7    | 0,045   |
| FePi (%)                                   | 22 (15; 31)  | 23 (14; 30)   | 22 (16; 32)  | 23 (15; 33)  | 0,567   |
| Serum-PTH (pg / ml)                        | 69 ± 54      | 70 ± 56       | 67 ± 45      | 70 ± 59      | 0,954   |
| Serum-Vitamin D<br>(ng / ml)               | 23 ± 13      | 22 ± 13       | 24 ± 13      | 23 ± 14      | 0,541   |
| Plasma-Calcium<br>(mmol / l)               | 2,4 ± 0,1    | 2,4 ± 0,1     | 2,4 ± 0,1    | 2,4 ± 0,1    | 0,030   |
| Therapie mit oralen<br>Eisenpräparaten (%) | 12 (2)       | 4 (2)         | 3 (2)        | 5 (3)        | 0,774   |
| Therapie mit i.v.<br>Eisenpräparaten (%)   | 7 (1)        | 3 (2)         | 3 (2)        | 1 (1)        | 0,562   |
| Therapie mit<br>Erythropoetin (%)          | 13 (2)       | 2 (1)         | 7 (4)        | 4 (2)        | 0,221   |
| Koronararterielle<br>Vorerkrankung (%)     | 119 (22)     | 41 (23)       | 42 (23)      | 36 (20)      | 0,722   |
| Zerebrovaskuläre<br>Vorerkrankung (%)      | 53 (10)      | 27 (15)       | 8 (4)        | 18 (10)      | 0,004   |
| Peripher-arterielle<br>Vorerkrankung (%)   | 36 (7)       | 11 (6)        | 13 (7)       | 12 (7)       | 0,909   |
| Σ Kardiovaskuläre<br>Vorerkrankung (%)     | 170 (31)     | 64 (35)       | 52 (29)      | 54 (30)      | 0,367   |

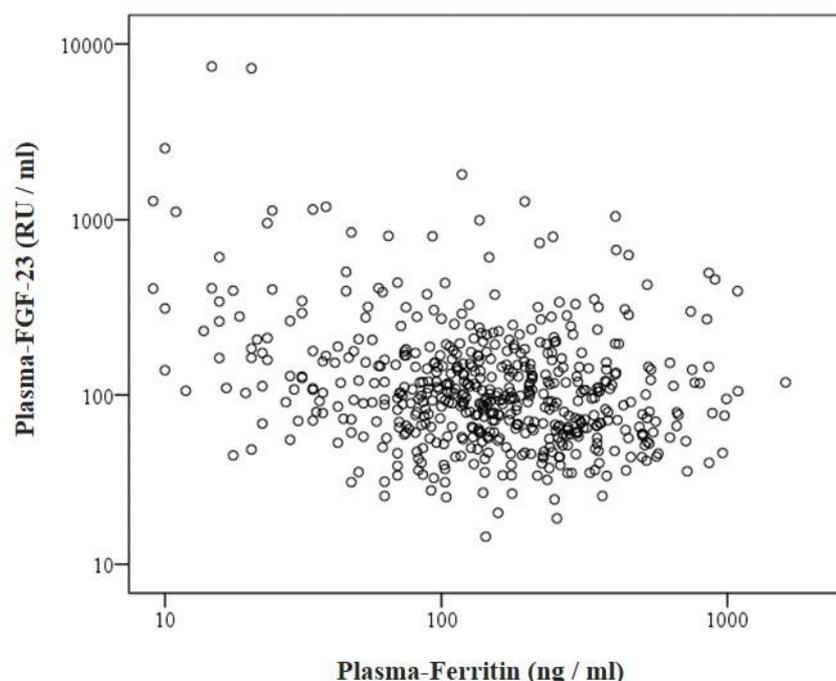
BMI: Body-Mass-Index,  $BD_{MAD/sys/dias}$ : mittlerer arterieller/systolischer/diastolischer Blutdruck, CRP: C-reaktives Protein, eGFR: geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, familiäre Prädisposition: Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Verwandten 1. Grades vor dem 65. Lebensjahr, FePi: fraktionelle Phosphatexkretion, i.v.: intravenös, LDL-Cholesterin: Low-density-Lipoprotein Cholesterin, Serum-Vitamin D: 25-OH-Hydroxy-Vitamin D, PTH: Parathormon, p (-Wert): Signifikanz, Σ: gesamt. Die Baselinecharakteristika sind angegeben als Anzahl (Prozent), Mittelwert (± Standardabweichung) oder Median (Interquartilsabstand). Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorier ANOVA mit Test auf linearen Trend, Kruskal-Wallis-Test oder  $\chi^2$ -Test.

## 5.2. Assoziation zwischen Plasma-Ferritin, Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels und der Nierenfunktion

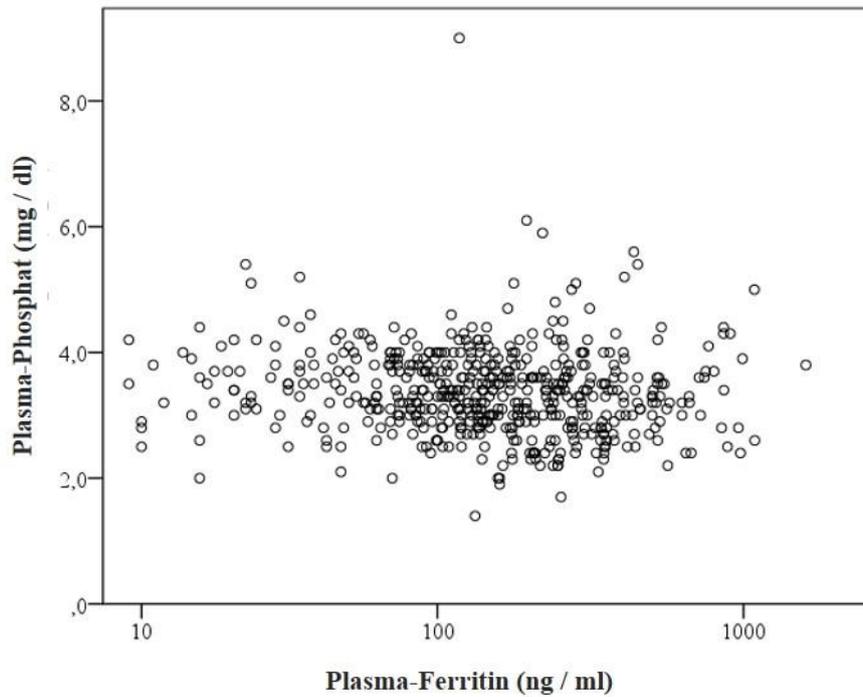
Zunächst fand sich den Erwartungen entsprechend eine negative Korrelation zwischen Plasma-Ferritin und Plasma-FGF-23 [ $r = -0,143$ ,  $p < 0,001$ ] und zwischen Plasma-Ferritin und Plasma-Phosphat [ $r = -0,092$ ,  $p = 0,002$ ], allerdings fand sich keine Assoziation zwischen Plasma-Ferritin und fraktioneller Phosphatexkretion [ $r = 0,024$ ,  $p = 0,419$ ] (**Abbildung 5 - 7**).

Nachfolgend erfolgte eine Stratifizierung des Patientenkollektivs anhand der GFR-Kategorien. Hierbei zeigte sich, dass mit einer zunehmenden Nierenfunktionseinschränkung das Plasma-FGF-23 anstieg, während für Plasma-Ferritin augenscheinlich kein Zusammenhang mit der GFR-Kategorie bestand (**Abbildung 8 und 9**). Weiterhin ließen sich mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion sowohl eine deutliche Erhöhung des Plasma-Phosphats als auch der fraktionellen Phosphatexkretion erkennen (**Abbildung 10 und 11**).

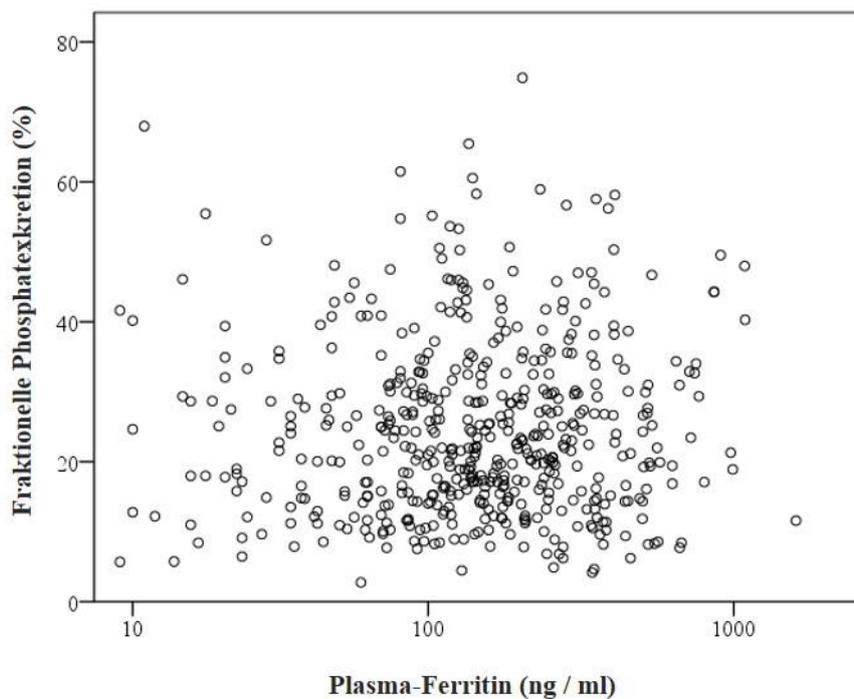
In diesem Zusammenhang wurden auch die Änderungen weiterer Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels untersucht, wobei festgestellt wurde, dass mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion das intakte Serum-Parathormon deutlich anstieg, während das Plasma-Calcium keine signifikante Änderung zeigte (**Abbildung 12 und 13**).



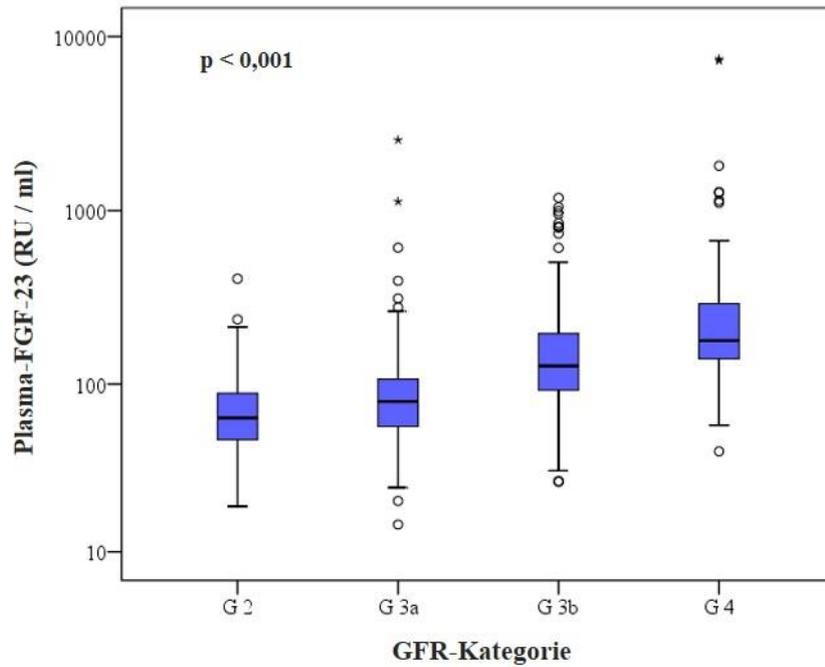
**Abbildung 5** Korrelation zwischen Plasma-FGF-23 und Plasma-Ferritin ( $r = -0,143$ ,  $p < 0,001$ ). Aufgrund fehlender Normalverteilung wurden Abszisse und Ordinate jeweils logarithmiert.



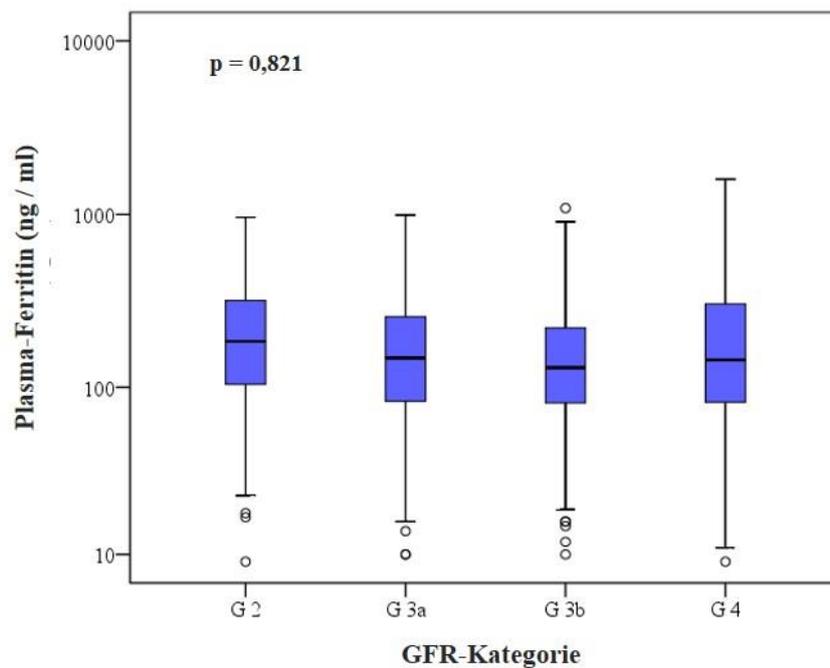
**Abbildung 6** Korrelation zwischen Plasma-Phosphat und Plasma-Ferritin, ( $r = -0,092$ ,  $p = 0,002$ ). Aufgrund fehlender Normalverteilung wurde die Abszisse logarithmiert.



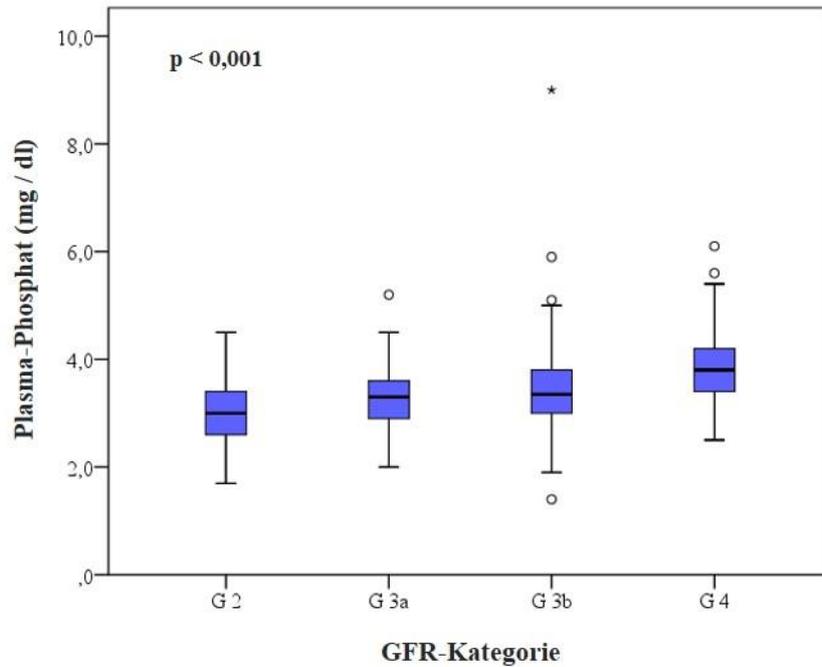
**Abbildung 7** Korrelation zwischen fraktioneller Phosphatexkretion und Plasma-Ferritin ( $r = 0,024$ ,  $p = 0,419$ ). Aufgrund fehlender Normalverteilung wurde die Abszisse logarithmiert.



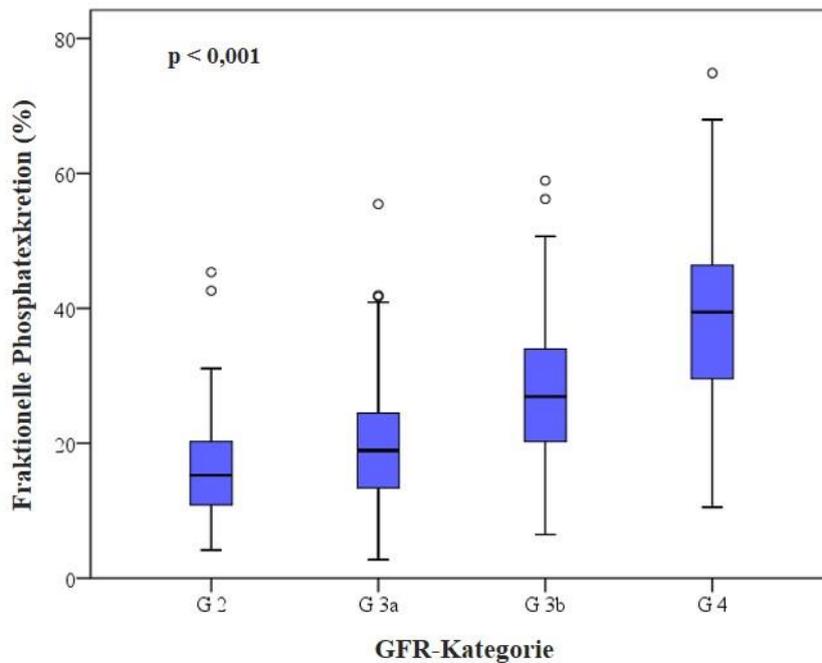
**Abbildung 8** Plasma-FGF-23 stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite, Ausreißer (°) und Extremwerte (\*). Zur statistischen Analyse der Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ordinate wurde logarithmiert.



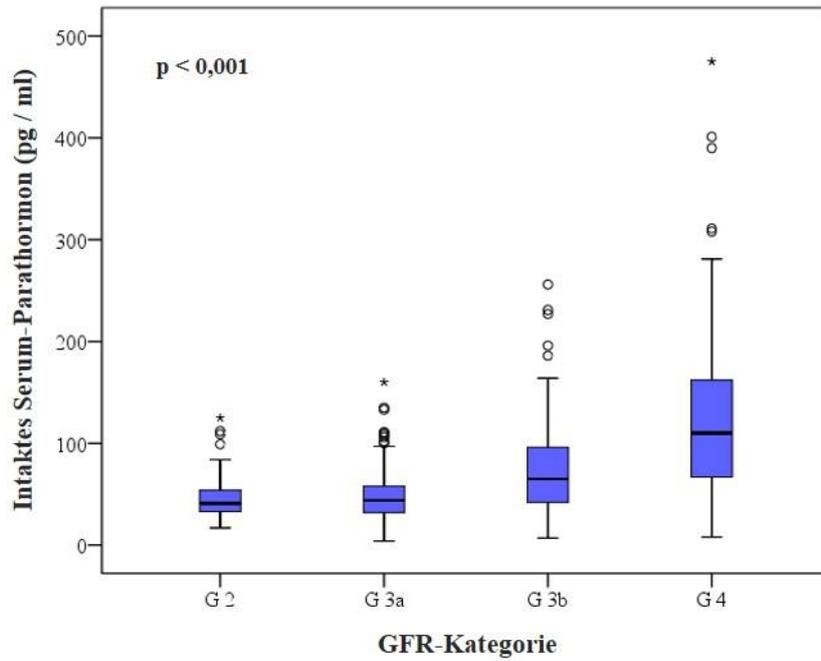
**Abbildung 9** Plasma-Ferritin stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite und Ausreißer (°). Zur statistischen Analyse der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA mit Test auf einen linearen Trend verwendet. Die Ordinate wurde logarithmiert.



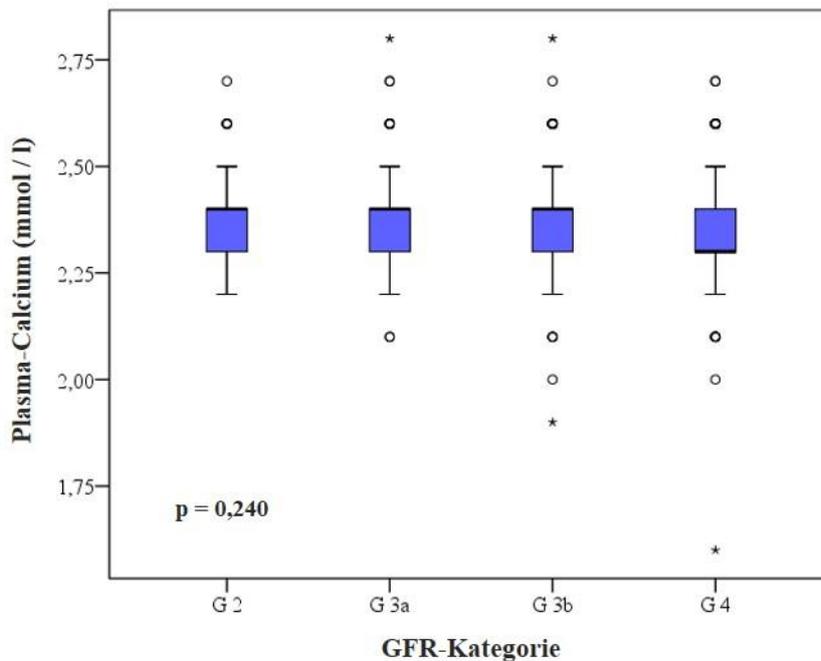
**Abbildung 10** Plasma-Phosphat stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite, Ausreißer (°) und Extremwerte (\*). Zur statistischen Analyse der Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Test auf einen linearen Trend verwendet.



**Abbildung 11** fraktionelle Phosphatexkretion stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite und Ausreißer (°). Zur statistischen Analyse wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.



**Abbildung 12** Intaktes Serum-Parathormon stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite, Ausreißer (°) und Extremwerte (\*). Zur statistischen Analyse der Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Test auf einen linearen Trend verwendet.



**Abbildung 13** Plasma-Calcium stratifiziert nach der GFR-Kategorie. Dargestellt sind Median, 25. sowie 75. Perzentile, Spannweite, Ausreißer (°) und Extremwerte (\*). Zur statistischen Analyse der Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Test auf einen linearen Trend verwendet.

### **5.3. Prüfung der klinischen Relevanz der Hypoferritinämie als möglichem Prädiktor kardiovaskulärer und renaler Ereignisse bei chronischer Nierenerkrankung**

Vor dem Hintergrund der negativen Assoziation zwischen Plasma-Ferritin und Plasma-FGF-23 ist die zentrale Hypothese dieser Dissertation, dass die schlechte kardiovaskuläre Prognose von Patienten mit hohem Plasma-FGF-23 nicht kausal aus einer direkten Plasma-FGF-23-Wirkung, sondern aus den Folgen eines zugrundeliegenden Eisenmangels resultiert. Daher wurde abschließend untersucht, ob eine Hypoferritinämie als Indikator eines Eisenmangels ein möglicher Mediator der bekannten Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und dem Auftreten kardiovaskulärer und renaler Ereignisse ist.

Während des hier berichteten Nachbeobachtungszeitraums erreichten 146 Patienten den primären kombinierten kardiovaskulären Studienendpunkt (kardiovaskuläres Ereignis und / oder Tod jedweder Genese), 135 Patienten erreichten den primären kombinierten renalen Studienendpunkt (Halbierung der eGFR und / oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit über mindestens 3 Monate und / oder Tod jedweder Genese) und 74 Patienten erreichten den sekundären renalen Studienendpunkt (Halbierung der eGFR und / oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit über mindestens 3 Monate). Die Subgruppenanalyse von Patienten mit einem CRP < 5 mg / l beinhaltete 401 Patienten, hiervon erreichten 95 Patienten den primären kombinierten kardiovaskulären Studienendpunkt, 90 den primären kombinierten renalen Studienendpunkt und 55 den sekundären renalen Studienendpunkt

Es wurden Überlebenszeitanalysen mittels des Kaplan-Meier-Verfahrens durchgeführt. Hierzu wurde die Patientenkohorte zunächst hinsichtlich ihres Plasma-FGF-23 in Tertile stratifiziert. Erwartungsgemäß war die Wahrscheinlichkeit, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden oder zu versterben, umso größer, je höher das Plasma-FGF-23 war (**Grafik a) Abbildung 14, p < 0,001**).

Nach Stratifizierung der Kohorte anhand des Plasma-Ferritins in Tertile konnte gezeigt werden, dass sich die kardiovaskuläre Ereignisrate zwischen den verschiedenen Ferritin-Tertilen nicht unterschied (**Grafik a) Abbildung 15, p = 0,334**). Dies änderte sich auch nicht, als in der Auswertung nur Patienten berücksichtigt wurden, die ein CRP < 5 mg / l aufwiesen, um auszuschließen, dass Plasma-Ferritin nicht den Eisenstatus, sondern stattdessen eine Inflamationsreaktion widerspiegeln könnte (**Grafik a) Abbildung 16, p = 0,159**).

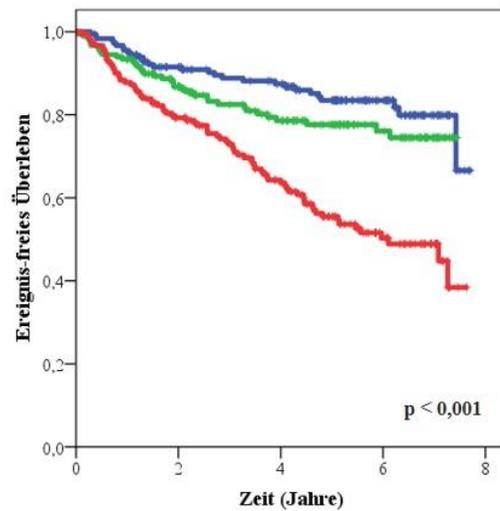
Nachfolgend wurden gleichermaßen die vordefinierten renalen Studienendpunkte, respektive der sekundäre renale Endpunkt (**jeweils Grafik b) Abbildungen 14 - 16**) sowie der primäre kombinierte renale Endpunkt (**jeweils Grafik c) Abbildungen 14 - 16**), untersucht.

Hierbei zeigte sich analog zu den kardiovaskulären Ereignissen, dass höheres Plasma-FGF-23 auch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten beider renalen Endpunkte assoziiert war (**Grafik b) und c) Abbildung 14, jeweils  $p < 0,001$** ), während Plasma-Ferritin die renalen Endpunkte nicht vorhersagte (**Grafik b) Abbildung 15,  $p = 0,057$  und Grafik c) Abbildung 15,  $p = 0,287$** ). Die Subgruppenanalyse der Patienten mit einem CRP  $< 5$  mg / l bestätigte diese Ergebnisse, da auch hier Plasma-Ferritin die renalen Endpunkte nicht prädizierte (**Grafik b) Abbildung 16,  $p = 0,340$  und Grafik c) Abbildung 16,  $p = 0,162$** ).

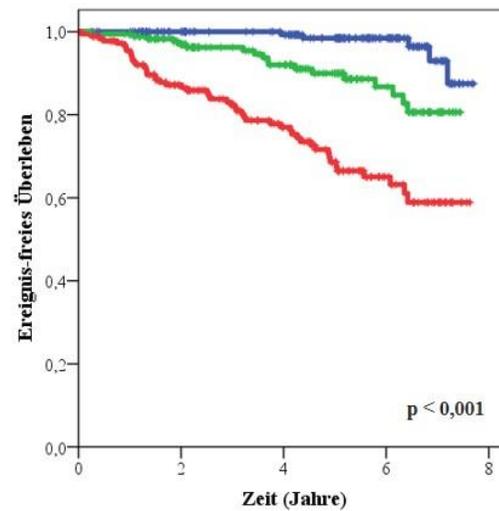
Zuletzt wurden univariate und multivariate Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die Analysen erfolgten jeweils unter Betrachtung der Ausgangsvariablen (Plasma-FGF-23 oder Plasma-Ferritin) als kontinuierliche Variable und als kategoriale Variable (nach Stratifizierung in Tertile). Hierbei konnte bestätigt werden, dass Plasma-FGF-23 seine unabhängige Rolle als Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse sowohl in univariaten Analysen als auch nach Korrektur für Plasma-Ferritin, nach zusätzlicher Korrektur für die eGFR und für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, mittlerer arterieller Blutdruck, Cholesterin) beibehält, während Plasma-Ferritin jeweils kein unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse war (**Tabelle 3**).

Plasma-FGF-23 war ferner auch nach Korrektur für Plasma-Ferritin, nach zusätzlicher Korrektur für die eGFR und für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, mittlerer arterieller Blutdruck, Cholesterin) ein unabhängiger Risikofaktor für das Erleiden renaler Ereignisse (**Tabelle 4**). Plasma-Ferritin seinerseits stellte dagegen bereits in univariaten Cox-Regressionsanalysen keinen Prädiktor renaler Ereignisse dar. Obgleich eine Korrektur für Plasma-FGF-23 (bei Betrachten von Plasma-Ferritin als kategoriale Variable, **Tabelle 4, Modell 2, dritte Tertile,  $p = 0,004$** ) und für Plasma-FGF-23 und eGFR (bei Betrachten von Plasma-Ferritin als kontinuierliche Variable, **Tabelle 4, Modell 2,  $p < 0,001$  und Modell 3,  $p = 0,002$** ) in einer signifikanten Assoziation zwischen Plasma-Ferritin und renalen Ereignissen resultierte, verlor sich diese Assoziation nach Korrektur für die eGFR (bei Betrachten von Plasma-Ferritin als kategorialer Variable, **Tabelle 4, Modell 3, dritte Tertile,  $p = 0,06$** ) beziehungsweise nach Korrektur für weitere klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (bei Betrachten von Plasma-Ferritin als kontinuierlicher Variable, **Tabelle 4, Modell 4,  $p = 0,37$** ).

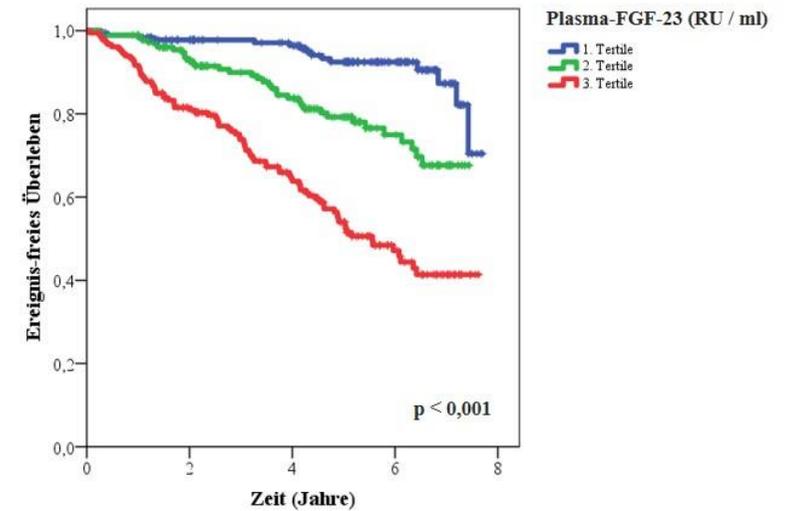
**a) Kardiovaskuläre  
Ereignisse / Tod**



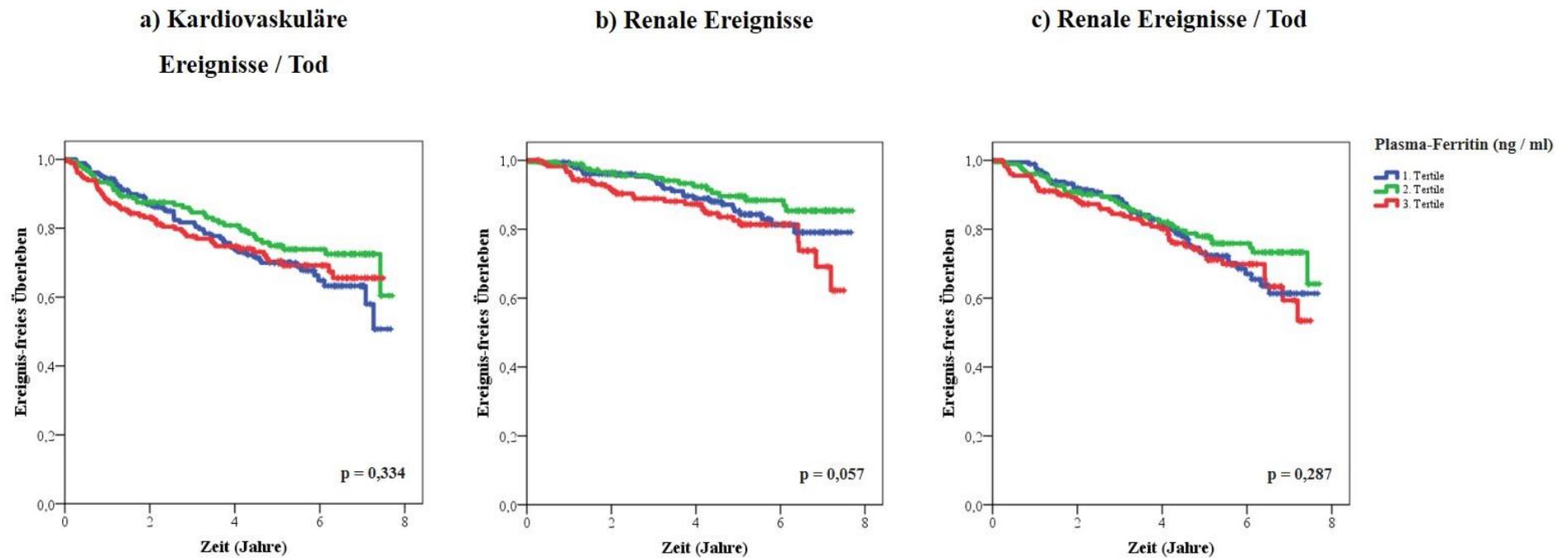
**b) Renale Ereignisse**



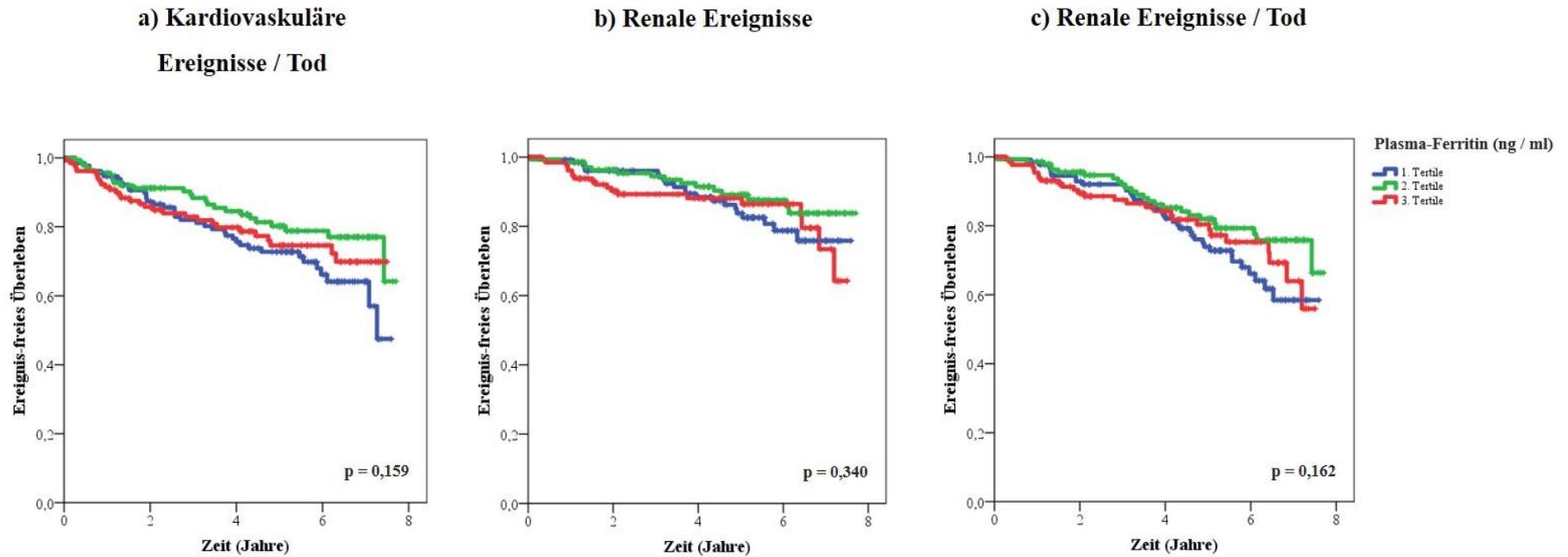
**c) Renale Ereignisse / Tod**



**Abbildung 14 Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank-Testung:** Dargestellt ist das Ereignis-freie Überleben nach Stratifizierung der Studienteilnehmer anhand von Plasma-FGF-23 in Tertile. Dargestellt sind die Daten der Gesamtkohorte; a) Kardiovaskuläre Ereignisse und / oder Tod jedweder Genese; b) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit; c) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit oder Tod jedweder Genese). Die Unterschiede zwischen den Tertilen zeigten sich für die Endpunkte a) - c) jeweils als signifikant mit  $p < 0,001$ .



**Abbildung 15 Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank-Testung:** Dargestellt ist das Ereignis-freie Überleben nach Stratifizierung der Studienteilnehmer anhand von Plasma-Ferritin in Tertile. Dargestellt sind die Daten der Gesamtkohorte; a) Kardiovaskuläre Ereignisse inklusive Tod jedweder Genese; b) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit; c) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit oder Tod jedweder Genese. Die Unterschiede zwischen den Tertilen zeigten sich für die Endpunkte a) - c) jeweils als nicht signifikant, respektive Endpunkt a)  $p = 0,334$ , Endpunkt b)  $p = 0,057$  und Endpunkt c)  $p = 0,287$ .



**Abbildung 16 Kaplan-Meier-Analyse mit Log-rank-Testung:** Dargestellt ist das Ereignis-freie Überleben nach Stratifizierung der Studienteilnehmer anhand von Plasma-Ferritin in Tertile. Dargestellt sind die Daten von Patienten mit einem CRP < 5 mg / l bei Studieneinschluss; a) Kardiovaskuläre Ereignisse inklusive Tod jedweder Genese; b) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR oder Erreichen der Dialysepflichtigkeit; c) Renale Ereignisse definiert als Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit oder Tod jedweder Genese. Die Unterschiede zwischen den Tertilen zeigten sich für die Endpunkte a) - c) jeweils als nicht signifikant, respektive Endpunkt a)  $p = 0,159$ , Endpunkt b)  $p = 0,340$  und Endpunkt c)  $p = 0,162$ .

| <b>Tabelle 3 Cox-Regressionsmodell (kombinierter primärer kardiovaskulärer Endpunkt: kardiovaskuläre Ereignisse und / oder Tod jedweder Genese)</b>   |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |
|---|----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|--|
| <b>AusgangsvARIABLE</b>   | <b>Modell 1</b>      |               | <b>Modell 2</b>      |               | <b>Modell 3</b>      |               | <b>Modell 4</b>      |               |  |
|   | <b>HR (KI 95%)</b>   | <b>p-Wert</b> |  |
| <b>Kontinuierliche Variablen</b>  |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |
| Log FGF-23 (RU / ml)  | 3,32 (2,34 bis 4,71) | <0,001        | 3,81 (2,56 bis 5,63) | <0,001        | 2,35 (1,45 bis 3,82) | 0,001         | 2,15 (1,32 bis 3,51) | 0,002         |  |
| Log Ferritin (ng / ml)  | 0,88 (0,58 bis 1,33) | 0,54          | 1,39 (0,93 bis 2,08) | 0,11          | 1,20 (0,79 bis 1,81) | 0,39          | 1,10 (0,73 bis 1,68) | 0,65          |  |
| <b>Kategoriale Variablen</b>  |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |
| Plasma-FGF-23   |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |
| zweite Tertile <sup>1</sup>   | 1,53 (0,94 bis 2,50) | 0,09          | 1,54 (0,94 bis 2,52) | 0,08          | 1,24 (0,75 bis 2,07) | 0,40          | 1,30 (0,78 bis 2,15) | 0,31          |  |
| dritte Tertile <sup>1</sup>   | 3,34 (2,17 bis 5,14) | <0,001        | 3,46 (2,23 bis 5,37) | <0,001        | 2,10 (1,24 bis 3,57) | 0,006         | 2,01 (1,17 bis 3,43) | 0,01          |  |
| Plasma-Ferritin   |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |
| zweite Tertile <sup>1</sup>   | 0,73 (0,49 bis 1,10) | 0,13          | 0,90 (0,59 bis 1,37) | 0,63          | 0,84 (0,55 bis 1,27) | 0,41          | 0,87 (0,57 bis 1,33) | 0,52          |  |
| dritte Tertile <sup>1</sup>   | 0,98 (0,68 bis 1,44) | 0,91          | 1,28 (0,86 bis 1,91) | 0,22          | 1,18 (0,79 bis 1,75) | 0,42          | 1,07 (0,70 bis 1,63) | 0,75          |  |
| <p>Modell 1 zeigt die univariate Analyse. Modell 2 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE). Modell 3 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE) und eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate). Modell 4 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE) und die eGFR sowie klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, respektive Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, mittlerer arterieller Blutdruck und Cholesterin.</p> <p><sup>1</sup>Bezugswert ist stets die 1. Tertile</p> <p>HR: Hazard Ratio, KI 95%: Konfidenzintervall zum Niveau von 95%, p-Wert: Signifikanzwert</p> |                      |               |                      |               |                      |               |                      |               |  |

| <b>Tabelle 4 Cox-Regressionsmodell (kombinierter primärer renaler Endpunkt: Halbierung der eGFR, Erreichen der Dialysepflichtigkeit und / oder Tod jedweder Genese)</b>   |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |
|---|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|--|
| <b>AusgangsvARIABLE</b>   | <b>Modell 1</b>       |               | <b>Modell 2</b>       |               | <b>Modell 3</b>      |               | <b>Modell 4</b>      |               |  |
|   | <b>HR (KI 95%)</b>    | <b>p-Wert</b> | <b>HR (KI 95%)</b>    | <b>p-Wert</b> | <b>HR (KI 95%)</b>   | <b>p-Wert</b> | <b>HR (KI 95%)</b>   | <b>p-Wert</b> |  |
| <b>Kontinuierliche Variablen</b>  |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |
| Log FGF-23 (RU / ml)  | 4,69 (3,45 bis 6,37)  | <0,001        | 7,90 (5,39 bis 11,57) | <0,001        | 3,20 (1,98 bis 5,17) | 0,001         | 3,43 (2,11 bis 5,58) | <0,001        |  |
| Log Ferritin (ng / ml)  | 1,17 (0,75 bis 1,82)  | 0,50          | 2,85 (1,84 bis 4,43)  | <0,001        | 1,98 (1,27 bis 3,06) | 0,002         | 1,63 (1,03 bis 2,56) | 0,37          |  |
| <b>Kategoriale Variablen</b>  |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |
| Plasma-FGF-23   |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |
| zweite Tertile <sup>1</sup>   | 2,92 (1,59 bis 5,35)  | 0,001         | 3,02 (1,65 bis 5,54)  | <0,001        | 1,93 (1,04 bis 3,60) | 0,04          | 1,97 (1,06 bis 3,68) | 0,03          |  |
| dritte Tertile <sup>1</sup>   | 7,34 (4,23 bis 12,74) | <0,001        | 8,42 (4,82 bis 14,69) | <0,001        | 2,93 (1,54 bis 5,57) | 0,001         | 3,29 (1,71 bis 6,33) | <0,001        |  |
| Plasma-Ferritin   |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |
| zweite Tertile <sup>1</sup>   | 0,77 (0,50 bis 1,18)  | 0,22          | 1,19 (0,75 bis 1,90)  | 0,46          | 0,95 (0,60 bis 1,49) | 0,82          | 0,91 (0,57 bis 1,44) | 0,68          |  |
| dritte Tertile <sup>1</sup>   | 1,10 (0,74 bis 1,64)  | 0,65          | 1,92 (1,23 bis 2,99)  | 0,004         | 1,51 (0,98 bis 2,32) | 0,06          | 1,17 (0,75 bis 1,85) | 0,49          |  |
| <p>Modell 1 zeigt die univariate Analyse. Modell 2 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE). Modell 3 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE) und eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate). Modell 4 ist korrigiert für Log Ferritin (falls [Log] FGF-23 AusgangsvARIABLE) / Log FGF-23 (falls [Log] Ferritin AusgangsvARIABLE) und die eGFR sowie klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, respektive Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, mittlerer arterieller Blutdruck und Cholesterin.</p> <p><sup>1</sup>Bezugswert ist stets die 1. Tertile</p> <p>HR: Hazard Ratio, KI 95%: Konfidenzintervall zum Niveau von 95%, p-Wert: Signifikanzwert</p> |                       |               |                       |               |                      |               |                      |               |  |

## **6. Diskussion**

### **6.1. Der chronisch nierenkranke Mensch als kardiovaskulärer Hochrisikopatient**

Patienten mit dialysepflichtiger chronischer Nierenerkrankung weisen eine im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöhte Mortalität auf [38]. Dabei können zwischen 40 bis 50% der Todesfälle auf kardiovaskuläre Ereignisse zurückgeführt werden [151, 208], wobei jüngere Publikationen zeigen konnten, dass bei Patienten mit fortgeschrittener CKD (chronic kidney disease) neben der kardiovaskulären auch die nicht-kardiovaskuläre Mortalität verglichen mit der Allgemeinbevölkerung um ein Vielfaches erhöht ist [38, 39, 96, 139].

Jedoch haben bereits Patienten mit nicht-dialysepflichtiger CKD gegenüber nierengesunden Menschen eine deutlich erhöhte kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität [30, 70]. Dies zeigt sich repräsentativ auch in der CARE for HOME Kohorte; hier wies jeder dritte Patient kardiovaskuläre Vorerkrankungen in der Anamnese auf.

Dies hat nicht nur weitreichende individuelle, sondern auch gesundheitsökonomische Konsequenzen, insbesondere wenn man die hohe Prävalenz der CKD sowohl global von annähernd 13% [85] als auch in den einzelnen Industrienationen wie den USA (14,8%) [207] beziehungsweise den USA und Kanada (15,5%) [85] sowie Europa (18,4%) [85] betrachtet. Zudem wurde in bevölkerungsbasierten US-amerikanischen Studien zumindest bis 2014 ein Anstieg der Patientenzahlen vermerkt. Insbesondere eine Zunahme der nicht-dialysepflichtigen CKD mit mittel- und hochgradiger Nierenfunktionseinschränkung wurde dabei berichtet [207]; gleichzeitig gaben zahlreiche Betroffene an, keine Kenntnis von der eigenen Nierenerkrankung zu haben. Dies kann entweder auf ein mangelhaftes Gesundheitsbewusstsein der betreffenden Personen oder aber auf einen unzureichenden Nachweis der CKD innerhalb der Allgemeinbevölkerung durch die behandelnden Ärzte zurückgeführt werden [203, 207].

Da die CKD selbst unabhängiger Prädiktor für die kardiovaskuläre und die Gesamt-Mortalität ist [30] und das Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität mit Verschlechterung der Nierenfunktion gradiert ansteigt [70], könnte ein frühzeitigeres Erkennen der CKD seitens betreuender Ärzte eine prognostisch relevante frühzeitigere Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen erlauben; insbesondere das Erkennen und die konsequente Behandlung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren spielen dabei eine wichtige Rolle [97, 124, 187].

So weisen Patienten mit CKD bekanntermaßen eine hohe Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren auf [206], die sich bereits daraus ergibt, dass in westlichen Industrienationen ein Diabetes mellitus und eine arterielle Hypertonie die beiden häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung und somit auch einer terminalen Niereninsuffizienz (ESRD, end stage renal disease) sind [28, 207, 219]. Zudem weisen Menschen mit CKD / ESRD unabhängig von ihrer Nierengrunderkrankung häufig einen Diabetes mellitus und / oder eine arterielle Hypertonie als Komorbiditäten auf [132, 203].

Ferner haben bevölkerungsbasierte epidemiologische Arbeiten ergeben, dass auch schon bei Menschen mit gering bis mittelgradig eingeschränkter Nierenfunktion eine höhere Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren (Diabetes mellitus (DM), Bluthochdruck, höheres Alter, Dyslipidämie) vorliegt als bei Menschen mit normaler Nierenfunktion [70, 121, 187]. In Einklang hiermit konnte auch in der CARE for HOME Kohorte eine hohe Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren gefunden werden: mehr als jeder dritte Patient hatte einen prävalenten DM, der mittlere Blutdruck betrug systolisch  $152 \pm 24$  mmHg und diastolisch  $85 \pm 13$  mmHg, der mittlere BMI lag bei  $30,4 \pm 5,5$  kg / m<sup>2</sup> und das mittlere LDL-Cholesterin bei  $115 \pm 37$  mg / dl.

Dennoch lässt sich die hohe Mortalität und die erhöhte kardiovaskuläre Ereignisrate bei CKD nicht allein durch die hohe Prävalenz der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren erklären [38, 100, 148]. So konnte durch konventionelle Therapieansätze mit strengerer Einstellung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren die kardiovaskuläre Ereignisrate bei CKD-Patienten in randomisierten Studien nicht signifikant gesenkt werden [54, 74, 166, 236].

In Übereinstimmung mit diesen ernüchternden Studienergebnissen wurde in den letzten Jahren erkannt, dass die hohe kardiovaskuläre Morbidität bei CKD-Patienten nicht allein durch die in der Allgemeinbevölkerung dominierenden atherosklerotischen Gefäßerkrankungen bedingt ist. Atherosklerotische Gefäßerkrankungen entstehen hierbei pathophysiologisch durch eine Plaque-Bildung im Bereich der Tunica-Intima betroffener Gefäße, insbesondere als Folge von arterieller Hypertonie, Nikotinabusus und fortgeschrittenem Alter sowie einer Dyslipidämie, und manifestieren sich klinisch meist als akuter Myokardinfarkt oder ischämischer Insult [176].

Bei CKD-Patienten stehen demgegenüber vielmehr arteriosklerotische Gefäßveränderungen im Zentrum der kardiovaskulären Erkrankungen. Arteriosklerotische Veränderungen entstehen dabei durch mikro- und makrovaskuläre Kalzifikationen im Bereich der Tunica-Media, wobei die Tunica-Intima in der Regel nicht mit einbezogen wird. Ähnliche arteriosklerotische Veränderungen finden sich häufig auch bei einem Diabetes mellitus [110, 188].

Da bei der Arteriosklerose ein Elastizitätsverlust der Gefäße auftritt, resultiert hieraus eine Erhöhung der kardialen Nachlast, die ihrerseits myokardiale Veränderungen verursacht. Hiermit übereinstimmend beschrieben epidemiologische Arbeiten eine Assoziation der arteriosklerotisch-bedingten Gefäßveränderungen bei CKD mit der Entstehung einer kardialen linksventrikulären Hypertrophie (LVH) [161]. Klinische Studien bestätigten daraufhin die vaskuläre Kalzifikation als einen unabhängigen Prädiktor für die LVH bei fortgeschrittener CKD [235]. Echokardiographische Veränderungen wie die LVH betreffen in fortgeschrittenen CKD-Stadien bis zu 75% der Patienten und sind dabei unabhängige Prädiktoren für die kardiovaskuläre Mortalität [60, 142].

Zusammenfassend rücken bei CKD-Patienten gegenüber den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die vor allem atherosklerotische Gefäßveränderungen verursachen, zunehmend die nicht-klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die zum Auftreten arteriosklerotischer Gefäßveränderungen und kardialen Strukturveränderungen wie der LVH beitragen, als mögliche Ursache für die schlechte kardiovaskuläre Prognose der CKD-Patienten in den Vordergrund. In Einklang zeigte die EVOLVE (EVALUATION OF Cinacalcet Hydrochloride (HCl) Therapy to Lower CardioVascular Events) Studie auf, dass etwa 25% der hier als „kardiovaskulär“ klassifizierten Todesfälle bei Dialysepatienten durch einen plötzlichen Herztod und damit nicht primär atherosklerotisch bedingt waren [223].

Zu den nicht-klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren bei einer CKD werden neben Elektrolytverschiebungen, oxidativem Stress, urämischen Toxinen, Hypervolämie und einer chronischen Inflammation insbesondere ein dysregulierter Calcium-Phosphat-Stoffwechsel (die sogenannte „Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder“, CKD-MBD) sowie eine (Eisenmangel-) Anämie gezählt [130, 176].

Die CKD-MBD kann dabei deskriptiv als CKD-assoziierte Mineral- und Knochen-Stoffwechselveränderung definiert werden. Sie ist charakterisiert durch niedrignormales bis vermindertes Plasma-Calcium, erniedrigtes Serum-Calcitriol (Vitamin D<sub>3</sub>), erhöhtes Plasma-Phosphat, erhöhtes Serum-Parathormon (PTH) sowie hohe Plasmaspiegel des in Osteoblasten und Osteozyten gebildeten phosphaturischen Hormons FGF-23 [2, 49]. Insgesamt resultiert hieraus eine Demineralisierung der Knochen, welche die Entstehung einer Osteoporose und das Auftreten pathologischer Frakturen bei CKD-Patienten begünstigt [24].

Darüber hinaus konnten in epidemiologischen Studien die aufgeführten Komponenten der CKD-MBD mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, respektive mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert werden [9, 24, 68, 177, 180, 198, 229].

In Einklang mit diesen epidemiologischen Studienerkenntnissen wurde in experimentellen Arbeiten erkannt, dass erhöhtes Plasma-Phosphat eine Gefäßverkalkung induziert [101, 131]. Die Exposition gegenüber hohen Plasma-Phosphatkonzentrationen führt dabei zu einer Umprogrammierung glatter Muskelzellen der Gefäßwand zu einem Osteoblasten-ähnlichen Zelltyp. Diese Zellen bilden unter dem Einfluss weiterer humoraler Faktoren analog zu physiologischen Knochenaufbauprozessen mikrokristalline, vesikuläre Calcium-Phosphat-Ablagerungen, die ursächlich für eine Gefäßverkalkung sind [188, 212]. Klinisch münden die schädigenden Effekte einer Hyperphosphatämie letztendlich in eine endotheliale Dysfunktion der Gefäße einerseits [189] sowie andererseits - über arteriosklerotische Prozesse - in die Entwicklung einer LVH [213]. Interessanterweise konnte bisher aber keine Interventionsstudie eine entscheidende kardiovaskuläre Prognoseverbesserung für CKD-Patienten durch Senkung des Plasma-Phosphats, etwa durch die orale Gabe von Phosphat-Bindern, beobachten [58, 163].

Darüber hinaus weisen viele CKD-Patienten im Rahmen der CKD-MBD einen sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT) auf, der mit mehr als 10-fach höheren Serum-PTH-Spiegeln als bei nierengesunden Individuen einhergehen kann. Sowohl ein Vitamin D-Mangel als auch eine hieraus entstehende Hypocalcämie sind dabei wesentliche Ursachen für die Entstehung eines sHPT [82, 88]. Obschon epidemiologische Studien hohe Serum-PTH-Spiegel mit einer erhöhten kardiovaskulären Ereignisrate assoziieren konnten [22, 198] und Erkenntnisse aus experimentellen Arbeiten einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Serum-PTH und der Entstehung myokardialer Schäden suggerieren [12], konnten klinische Studien wie die große prospektive bevölkerungsbasierte ARIC Studie im Gegensatz dazu erhöhtes Serum-PTH nicht als unabhängigen Risikofaktor für inzidente kardiovaskuläre Erkrankungen bestätigen [63]; ferner konnte im Rahmen der randomisierten klinischen Interventionsstudie EVOLVE keine eindeutige kardiovaskuläre Prognoseverbesserung durch die Therapie eines prävalenten sHPT mittels des Calcimimetikums Cinacalcet bei Dialysepatienten beobachtet werden [223].

Schließlich wird für die CKD auch eine mögliche kardiovaskuläre Schädigung durch einen Calcitriol-Mangel diskutiert: Experimentelle Arbeiten zeigen, dass Serum-Calcitriol positive Effekte sowohl auf das kardiale Remodelling [27] als auch auf die Blutdruckregulation [210] haben und darüber hinaus eine atherosklerotische Plaque-Bildung sowie vaskuläre Kalzifikationsprozesse hemmen kann [87, 125, 162]. Beobachtungsstudien zeigten allerdings eine nicht-lineare Beziehung zwischen Serum-Calcitriol und kardiovaskulären Ereignissen; hierbei war niedriges Serum-Calcitriol zu Studienbeginn Prädiktor für die kardiovaskuläre und die Gesamtmortalität, allerdings war auch sehr hohes Serum-Calcitriol mit einer schlechteren

kardiovaskulären Prognose assoziiert, anstatt erwartungsgemäß protektiv zu wirken [149, 218]. In Interventionsstudien konnte dementsprechend bislang keine eindeutige (kardiovaskuläre) Prognoseverbesserung bei CKD-Patienten durch Vitamin-D-Gabe erzielt werden [103, 138].

Vor dem Hintergrund dieser ernüchternden Studienergebnisse zu den meisten CKD-MBD-Komponenten wurde in den letzten Jahren eine mögliche kardiovaskuläre Bedeutung des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23 intensiv diskutiert. Epidemiologisch lässt sich dabei mit abnehmender GFR zunehmend erhöhtes Plasma-FGF-23 feststellen, sodass Menschen mit fortgeschrittener CKD verglichen mit nierengesunden Menschen oft mehr als 100-fach höhere Plasma-FGF-23-Spiegel aufweisen [120].

Während experimentelle Studien zu vaskulären Effekten von Plasma-FGF-23 teilweise divergierende Ergebnisse erbrachten, wobei letztlich Plasma-FGF-23 die Kalzifikation glatter Gefäßmuskelzellen vermutlich nicht induziert [87, 126], wurden tierexperimentell direkte Effekte von Plasma-FGF-23 auf Kardiomyozyten nachgewiesen, durch welche Plasma-FGF-23 wohl Blutdruck-unabhängig eine LVH induzieren kann [53, 73]. Aufgrund dessen wurde bereits postuliert, dass Plasma-FGF-23 ein interessantes pharmakologisches Ziel für neue prognoseverbessernde Therapieansätze bei Menschen mit CKD sein könnte.

Mit den berichteten experimentellen Daten übereinstimmend, wurde auch klinisch eine Assoziation von Plasma-FGF-23 mit einer prävalenten und inzidenten LVH [53, 77, 178], einer schlechten kardiovaskulären Prognose, einer erhöhten Mortalität [78, 109, 180] sowie mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer Dialysepflichtigkeit gefunden [57, 94, 109]. Zudem war in früheren Auswertungen der CARE for HOME Studie Plasma-FGF-23 auch unabhängiger und robuster Prädiktor für kardiale Dekompensationen und / oder Tod [181].

Mit der vorgelegten Dissertationsarbeit lassen sich nun diese früheren Ergebnisse aus CARE for HOME erweitern, da zum Zeitpunkt der Datenauswertungen eine größere Patientenkohorte und ein längerer Nachbeobachtungszeitraum zur Verfügung stand. Gegenüber den älteren CARE for HOME Analysen, in denen Plasma-FGF-23 seine Stellung als Prädiktor für atherosklerotische Ereignisse nach Adjustierung für die eGFR verloren hatte [181], lässt sich nun zeigen, dass Plasma-FGF-23 auch atherosklerotische Ereignisse in CARE for HOME robust prädiziert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit vorherigen klinischen Arbeiten, die ebenfalls Plasma-FGF-23 mit atherosklerotischen Ereignissen assoziieren konnten [109, 135], während andere Studien wiederum keine Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen nachweisen beziehungsweise hohes Plasma-FGF-23 nicht als Prädiktor für das Auftreten atherosklerotischer Ereignisse bestätigen konnten [43, 197].

Im Kontext dieser divergierenden epidemiologischen Studienergebnisse beobachteten Scialla *et al.* in der nordamerikanischen CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Studie, dass die Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen (definiert als Hospitalisierung aufgrund eines akuten Myokardinfarkts, Schlaganfalls und / oder eines peripher-vaskulären Ereignisses) signifikant, aber gleichwohl deutlich schwächer war als die Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und kardialen Ereignissen (definiert als Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz / kardialen Dekompensation) [177]. Dies stimmt mit Beobachtungen aus weiteren großen Studien wie der bevölkerungsbasierten CHS (Cardiovascular Health Study) Studie und der interventionellen EVOLVE Studie überein, die ebenfalls eine Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen fanden, wobei sich diese vergleichen mit der Assoziation zwischen Plasma-FGF-23 und kardialen Ereignissen als deutlich schwächer präsentierte [95, 153].

Ähnlich zeigen die früheren CARE for HOME Auswertungen eine starke Assoziation von Plasma-FGF-23 mit kardialen Ereignissen, die auch in multivariaten Analysen signifikant blieb; demgegenüber war die Assoziation zwischen Plasma-FGF-23 und atherosklerotischen Ereignissen schwächer und blieb in den anschließenden multivariaten Analysen nicht erhalten [181]. Übereinstimmend finden sich auch in der Allgemeinbevölkerung Hinweise darauf, dass erhöhtes Plasma-FGF-23 bei Menschen mit normaler Nierenfunktion kardiale Ereignisse deutlich besser als atherosklerotische Ereignisse prädiziert [95].

Ferner decken rezente *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen auf, dass unsere bisherigen Erkenntnisse über Plasma-FGF-23 und dessen (Patho-) Physiologie noch lückenhaft sind.

So konnten rezente experimentelle Arbeiten die präsumtiven direkt kardiotoxischen Effekte von Plasma-FGF-23 nicht einheitlich verifizieren [190, 231]; zwischenzeitlich wurden sogar kardioprotektive Eigenschaften von Plasma-FGF-23 diskutiert [194]. Im pathophysiologischen Kontext der Herzinsuffizienz konnte experimentell eine relevante „ektope“ FGF-23-Expression in Kardiomyozyten nachgewiesen werden [173]. In einem Mausmodell mit artifiziell induziertem Myokardinfarkt ließ sich ferner eine signifikant gesteigerte Expression von Plasma-FGF-23 in Osteozyten, aber auch in Kardiomyozyten feststellen [13]. In Einklang fordern auch klinische Studien das bisherige Verständnis des Zusammenhangs zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und kardialer Schädigung heraus: so konnte gezeigt werden, dass Patienten mit akutem kardiogenem Schock einen massiven Plasma-FGF-23-Anstieg erfahren, der mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [66, 168]. Da diese Patienten mehrheitlich wohl nicht an einer fortgeschrittenen CKD als primärem Induktor erhöhter Plasma-FGF-23-Spiegel

litten, kann gefolgert werden, dass die massive Plasma-FGF-23-Freisetzung dem kardiogenen Schock folgt und diesem nicht vorausgeht. Demnach lässt sich die Hypothese aufstellen, dass erhöhtes Plasma-FGF-23 nicht obligat die Ursache, sondern möglicherweise auch die Folge einer myokardialen Schädigung sein könnte. Darüber hinaus berichtete eine aktuelle Beobachtungsstudie, dass Patienten mit FGF-23-assoziierten hypophosphatämischen Erkrankungen wie beispielsweise der hypophosphatämischen Rachitis / Osteomalazie, die lebenslang hohen Plasma-FGF-23-Spiegeln exponiert sind, nicht überproportional häufig eine LVH als Ausdruck einer kardialen Schädigung entwickeln [195].

Insgesamt zeigt dies, dass eine kausale pathophysiologische Rolle von Plasma-FGF-23 in der Entstehung kardiovaskulärer und insbesondere myokardialer Erkrankungen bei CKD nicht eindeutig bewiesen ist. Vielmehr könnte erhöhtes Plasma-FGF-23 auch lediglich Reflektor anderer, pathophysiologisch relevanter Risikofaktoren sein, die ihrerseits eine kausale oder mediierende Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD-Patienten haben.

Von großer Bedeutung ist dabei insbesondere, dass in rezenten Arbeiten ein Eisenmangel als Induktor der Plasma-FGF-23-Bildung erkannt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass ein Eisenmangel im Tierexperiment eine Steigerung der Plasma-FGF-23-Synthese induziert [37, 52]; weiterhin konnte in klinischen Studien sowohl bei nierengesunden [228] als auch bei nierenkranken Menschen eine Assoziation von erhöhtem Plasma-FGF-23 mit einem Eisenmangel und / oder einer Anämie gefunden werden [23, 147, 156, 202].

Dies hat deshalb eine hohe Relevanz, da die CKD bereits in frühen Stadien regelhaft mit einer multifaktoriellen Anämie assoziiert ist [193], deren Hauptursachen die Suppression der renalen EPO-Produktion und ein Eisenmangel sind [18]. Dabei ist die Anämie Prädiktor für Mortalität, kardiovaskuläre Ereignisse und für das Eintreten einer Dialysepflichtigkeit [91, 114, 129, 232]; ein Eisenmangel allein wurde als Prädiktor für das Gesamtüberleben identifiziert [29, 44, 113].

In diesem Zusammenhang wird zunächst postuliert, dass ein Eisenmangel zu der starken Erhöhung von Plasma-FGF-23 bei CKD beiträgt. Weiter soll die Hypothese geprüft werden, dass der Eisenmangel hierbei der entscheidende Einflussfaktor auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei CKD-Patienten ist. Dazu soll im Folgenden zunächst die (patho-) physiologische Bedeutung von Plasma-FGF-23 und seine kontrovers diskutierte Rolle hinsichtlich des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen erörtert sowie nachfolgend die pathophysiologische Entstehung und Diagnostik eines Eisenmangels bei CKD sowie anschließend die Interaktion zwischen einem Eisenmangel und der Erhöhung von Plasma-FGF-23 im Kontext der CKD diskutiert werden.

## 6.2. Plasma-FGF-23 als Schlüsselhormon der CKD

Die Rolle des phosphaturischen Hormons Plasma-FGF-23 als zentralem Parameter der CKD wurde seit seiner Erstbeschreibung in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv untersucht.

Physiologisch wird Plasma-FGF-23 in Osteoblasten und Osteozyten gebildet und bei hohen Plasma-Phosphatkonzentrationen ausgeschüttet. Plasma-FGF-23 vermittelt seine klassischen Effekte an definierten Zielorganen über die Bindung von FGF-Rezeptoren in Anwesenheit des obligaten Ko-Rezeptors  $\alpha$ -Klotho. Die Folgen sind eine gesteigerte renale Phosphatexkretion durch Hemmung tubulärer Natrium-Phosphat-Kotransporter sowie eine verminderte intestinale Phosphatresorption, wodurch die Entstehung einer Hyperphosphatämie auch bei gering- bis mittelgradig eingeschränkter GFR verhindert wird [83, 100]. Weiterhin hemmt Plasma-FGF-23 die renale Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase, des Schrittmacherenzym der Calcitriolsynthese, während es gleichzeitig den Calcitriolabbau durch die 24-Hydroxylase induziert, was einen Calcitriolmangel verursachen kann [184]. Die intestinale Calcium- und Phosphatresorption wird hierdurch gehemmt und die Entstehung eines sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT) begünstigt. Serum-Calcitriol selbst induziert wiederum die Plasma-FGF-23-Synthese [127]. Ferner supprimiert Plasma-FGF-23 die Parathormon (PTH) -Synthese *in vitro* und *in vivo* [21, 115, 136]. Umgekehrt scheint PTH die Plasma-FGF-23-Synthese *in vitro* zu stimulieren [171], während die Studienergebnisse *in vivo* hierzu widersprüchlich sind; was zumindest teilweise durch die Wechselwirkungen von Serum-PTH mit Plasma-Phosphat und Serum-Calcitriol, welche wiederum Plasma-FGF-23 beeinflussen, erklärt werden kann [83]. Interessanterweise findet man bei Patienten mit fortgeschrittener CKD neben einem erhöhten Plasma-FGF-23 oft auch ein erhöhtes Serum-PTH im Rahmen eines sHPT, was auch in CARE for HOME bestätigt werden kann. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Entwicklung einer Urämie-bedingten Plasma-FGF-23-Resistenz der Nebenschilddrüse im Verlauf der CKD [67, 86].

Bei CKD steigt Plasma-FGF-23 mit fallender GFR stetig an, um die Phosphathomöostase aufrechtzuerhalten und eine Hyperphosphatämie zu verhindern. In fortgeschrittenen Stadien weisen CKD-Patienten jedoch trotz erhöhtem Plasma-FGF-23 oft eine Hyperphosphatämie auf, da auch bei massiv stimulierter tubulärer Ausscheidung die glomeruläre Filtration von Plasma-Phosphat zu gering ist, um eine adäquate renale Phosphatausscheidung zu ermöglichen [81].

Erhöhtes Plasma-FGF-23 ist mit einer schlechten kardiovaskulären Prognose und erhöhter Mortalität assoziiert [78, 109]. In Einklang zeigte sich auch in der CARE for HOME Studie, dass Plasma-FGF-23 ein robuster Prädiktor für renale sowie kardiovaskuläre Ereignisse ist.

Ein wichtiger Pathomechanismus, der zu der hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von CKD-Patienten beiträgt, ist die kardiale linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) [42, 165].

In diesem Zusammenhang wurde 2009 epidemiologisch von Gutierrez *et al.* [77] eine unabhängige Assoziation der LVH mit erhöhtem Plasma-FGF-23 in einer Kohorte mit 58 nierengesunden Menschen sowie 162 CKD-Patienten festgestellt. Um zu klären, ob diese Assoziation kausal ist und ob Plasma-FGF-23 potenziell direkte Effekte auf kardiale Strukturen hat, wurden verschiedene epidemiologische und experimentelle Studien durchgeführt.

So bestätigten Faul *et al.* [53] zunächst durch Analysen der großen nordamerikanischen CRIC Kohorte die bekannte epidemiologische Assoziation von erhöhtem Plasma-FGF-23 und einer prävalenten LVH bei CKD; zudem konnte beobachtet werden, dass in der CRIC Kohorte erhöhtes Plasma-FGF-23 auch mit der Neuentstehung einer LVH assoziiert war.

Die postulierte kausale Bedeutung von Plasma-FGF-23 für die LVH-Entstehung bei CKD untersuchten Faul *et al.* [53] nachfolgend experimentell. Hierbei wurden Herzmuskelzellen neonataler Ratten *in vitro* mit Plasma-FGF-23 behandelt; anschließend konnte eine verstärkte Expression von fetalem  $\beta$ -MHC (beta-myosin heavy chain) bei verminderter Expression des adulten  $\alpha$ -MHC (alpha-myosin heavy chain) als etablierten Markern einer pathologischen kardialen Hypertrophie mittels RT-PCR gemessen werden. Die Gabe eines Pan-FGF-Rezeptor-Blockers hemmte derartige Effekte auf Kardiomyozyten *in vitro*. Um diese Plasma-FGF-23-Effekte auch *in vivo* nachvollziehen zu können, wurde Wild-Typ-Mäusen rekombinantes Plasma-FGF-23 intramyokardial und intravenös gespritzt; beides resultierte histologisch und echokardiographisch in einer LVH. Zusätzlich wiesen Mäuse mit einer homozygoten oder heterozygoten Mutation des Plasma-FGF-23-Korezeptors  $\alpha$ -Klotho, dessen vollständige oder partielle Inaktivierung zu einer graduierten, gegenregulatorischen Plasma-FGF-23-Erhöhung führte, im Verlauf kardiale Strukturveränderungen auf. Diese waren bei homozygoten Tieren, die höhere Plasma-FGF-23-Spiegel aufwiesen, deutlich ausgeprägter als bei den heterozygoten Tieren; dies wies auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Plasma-FGF-23-Effekte hin. Zuletzt wurden die Plasma-FGF-23-Effekte an Ratten untersucht, die nach einer 5/6-Nephrektomie aufgrund ihrer Nierenfunktionseinschränkung deutlich erhöhte Plasma-FGF-23-Spiegel aufwiesen. Die Injektion eines Pan-FGF-Rezeptor-Blockers hemmte in Einklang mit den *in vitro* Ergebnissen im Vergleich zu der Kontrollgruppe die Entstehung einer LVH *in vivo*.

Di Marco *et al.* [40] erweiterten diese experimentellen Studienergebnisse unter Verwendung des gleichen 5/6-Nephrektomie Rattenmodells, wobei die schlechtere Nierenfunktion auch hier in höherem Plasma-FGF-23 als bei nierengesunden Kontrolltieren resultierte und konsekutiv in

die Entstehung einer LVH mündete. Es erfolgte - wie schon in der experimentellen Studie von Faul *et al.* [53] - die Gabe eines Pan-FGF-Rezeptor-Blockers. Nachfolgend konnte zum einen echokardiographisch eine Reduktion der linksventrikulären Muskelmasse und zum anderen histologisch ein deutlicher Rückgang einer myokardialen Fibrose als typischem Kennzeichen einer LVH festgestellt werden. Während Faul *et al.* [53] demnach tierexperimentell gezeigt hatten, dass eine FGF-Rezeptor-Blockade bei CKD die Entstehung einer LVH hemmen kann, konnten Di Marco *et al.* [40] zusätzlich aufzeigen, dass eine Blockade der FGF-Rezeptoren eine prävalente LVH im Tiermodell mit CKD - zumindest partiell – rückgängig machen kann.

Später identifizierten Grabner *et al.* [73] speziell den FGF-Rezeptor 4 als relevanten kardialen Plasma-FGF-23-Rezeptor. Zunächst wurde hierbei *in vitro* in Zellkulturanalysen gezeigt, dass Plasma-FGF-23 in Abwesenheit seines Ko-Rezeptors  $\alpha$ -Klotho auf Kardiomyozyten den FGFR 4 aktivieren kann. Die pathophysiologische Relevanz des FGFR 4 *in vivo* wurde nachfolgend durch die Untersuchung von Mäusen mit einer „loss-of-function“-Mutation des FGFR 4 untersucht. So entwickelten die mutierten Mäuse mit funktionslosem FGFR 4, anders als die Wildtyp-Mäuse, unter phosphatreicher Diät und konsekutiv erhöhtem Plasma-FGF-23 keine LVH. Anschließend konnte die intraperitoneale Gabe eines selektiven FGFR 4-Blockers die Entstehung einer LVH im 5/6-nephrektomierten Rattenmodell deutlich abmildern, ohne dabei die Plasma-FGF-23-Spiegel, den Blutdruck oder die Nierenfunktion signifikant zu verändern. Daher wurde angenommen, dass eine selektive Blockade des FGFR 4 auch in der klinischen Anwendung bei CKD-Patienten das kardiale Remodelling hemmen und so die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität reduzieren könnte, ohne die physiologisch wichtigen Effekte von Plasma-FGF-23 - insbesondere für die Phosphathomöostase - zu beeinträchtigen.

Allerdings wurden alle diese Arbeiten von Mitgliedern derselben Arbeitsgruppe veröffentlicht. Andere Arbeitsgruppen konnten in mehreren experimentellen Studien die beschriebenen unmittelbar kardiotoxischen Effekte von Plasma-FGF-23 nicht einheitlich reproduzieren.

So konnten Agarwal *et al.* [10] im Gegensatz zu Faul *et al.* [53] bei  $\alpha$ -Klotho-defizienten Mäusen als Modell für stark erhöhte Plasma-FGF-23-Spiegel weder bildmorphologisch noch histologisch eine LVH nachweisen. Weiterhin fanden Slavic *et al.* [190] in einem Mausmodell, dass die Entstehung einer LVH aufgrund einer kardialen Nachlasterrhöhung weder durch Plasma-FGF-23 noch durch dessen Ko-Rezeptor  $\alpha$ -Klotho beeinflusst wurde.

Schließlich berichteten Matsui *et al.* [140] bei Mäusen mit einer schweren LVH aufgrund einer Kardiomyozyten-spezifischen Gen-Mutation eine Erhöhung von Plasma-FGF-23 am ehesten aufgrund einer kardiomyozytären Plasma-FGF-23-Bildung; eine osteozytäre Überproduktion

konnte dabei nicht nachgewiesen werden. So wurde postuliert, dass erhöhtes Plasma-FGF-23 weniger die Ursache als vielmehr eine Folge- oder Begleiterscheinung der LVH sein könnte.

Weitere experimentelle Arbeiten zeigten potenzielle Gefahren auf, die eine pharmakologische Antagonisierung von Plasma-FGF-23 mit dem Ziel der Kardioprotektion mit sich bringen kann; diese waren primär durch Hemmung der Phosphat-regulierenden Effekte von Plasma-FGF-23 bedingt. So mündete eine Pan-FGF-Rezeptor-Blockade nicht unerwartet in einer massiven Dysregulation der Phosphathomöostase mit einer ausgeprägten Hyperphosphatämie, die aus der fehlenden Möglichkeit zur adäquaten renalen Phosphatausscheidung resultierte. Dabei wurde das Auftreten von Gewebe- und Gefäßverkalkungen sowie relevanten echokardiographischen Veränderungen beobachtet, wobei letztere auf eine diastolische Dysfunktion hinwiesen [234]. In einem anderen Tiermodell hatte die antikörpervermittelte Plasma-FGF-23-Antagonisierung bei 5/6-nephrektomierten Ratten zwar eine Senkung des Serum-PTH sowie einen Anstieg des Serum-Calcitriol und konsekutiv die Besserung eines prävalenten sHPT zur Folge; es traten aber auch hier - analog zu der Pan-FGF-Rezeptor-Blockade - eine Hyperphosphatämie sowie vaskuläre Kalzifikationen auf, was letztlich mit einer erhöhten Mortalität assoziiert war [182].

Neben der Schwierigkeit der Interpretation dieser divergierenden experimentellen Studienergebnisse bleiben auch noch epidemiologische Unklarheiten: So bleibt weiterhin unverstanden, welcher Stimulus der initiale Auslöser des Plasma-FGF-23-Anstiegs ist, der schon bei geringer Nierenfunktionseinschränkung beobachtet werden kann. Die anfängliche Hypothese, dass dieser frühe Plasma-FGF-23-Anstieg durch eine Hyperphosphatämie zu Beginn einer CKD verursacht sein könnte, steht nicht in Einklang mit der Beobachtung, dass Plasma-FGF-23 bereits ansteigt, wenn Plasma-Phosphat aber auch andere Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels noch in ihrem laborchemischen Referenzbereich liegen [93].

Allerdings könnten Faktoren außerhalb des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels, respektive außerhalb der klassischen CKD-MBD, einen Anstieg von Plasma-FGF-23 bereits bei nur geringgradig eingeschränkter GFR auslösen.

In diesem Zusammenhang ist von besonderer Bedeutung, dass auf Grundlage rezenter experimenteller [37, 52] und klinischer [228] Arbeiten der bei CKD-Patienten hochprävalente Eisenmangel als ein möglicher auslösender Pathomechanismus diskutiert wird; demnach könnte ein Eisenmangel neben oder bereits vor einer messbaren Veränderungen der CKD-MBD-Parameter eine Freisetzung von Plasma-FGF-23 schon in frühen CKD-Stadien induzieren [230].

Die Überprüfung einer Assoziation zwischen einem Eisenmangel und einem Plasma-FGF-23-Anstieg sowie deren prognostische Relevanz für die kardiovaskuläre und renale Prognose der Patienten der CARE for HOME Kohorte ist Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit.

### **6.3. Der pathophysiologische Hintergrund und die diagnostischen Herausforderungen eines Eisenmangels bei CKD**

Der Eisenmangel stellt eine häufige Begleiterscheinung der CKD dar [55]. Gleichzeitig gehört der Eisenmangel neben dem EPO- (Erythropoetin) Mangel zu den Hauptursachen einer Anämie bei CKD [17]. Eine Anämie ist dabei oft mit belastenden Symptomen wie Müdigkeit, Schwäche und Kopfschmerzen assoziiert [56] und tritt mit Voranschreiten der CKD zunehmend häufiger auf [15, 141]. Darüber hinaus sind sowohl der Eisenmangel [16, 29, 44, 113] als auch die Anämie allgemein [91, 114, 129, 215] bei CKD-Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Eine regelmäßige Überprüfung der Hämoglobinkonzentration und der Parameter des Eisenstatus hat daher insbesondere bei Progression der CKD große Bedeutung [3].

Während die Anämie dabei durch die Hämoglobinkonzentration eindeutig definiert ist, stellt die Evaluation des Eisenstatus bei CKD-Patienten eine größere Herausforderung dar.

Bereits in der Allgemeinbevölkerung wurden verschiedene Referenzwerte für die Diagnostik des Eisenmangels vorgeschlagen [222]; so ist laut der WHO ein Plasma-Ferritin  $< 15$  ng / ml hinweisend für einen Eisenmangel bei Erwachsenen [8, 225]. In anderen Arbeiten wird jedoch aufgrund einer deutlich höheren Sensitivität ein Plasma-Ferritin  $< 30$  ng / ml als Grenzwert für die Diagnose eines Eisenmangels innerhalb der Allgemeinbevölkerung empfohlen [35, 133].

Die Diagnose des Eisenmangels bei CKD-Patienten ist durch zwei Probleme erschwert:

Während das Plasma-Ferritin bei nierengesunden Menschen die körpereigenen Eisenreserven zumeist gut widerzuspiegeln vermag [8], wird das Plasma-Ferritin bei CKD-Patienten von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die dessen Messung verfälschen können. Hierzu zählt insbesondere die CKD-assoziierte chronische Inflammation, da das Plasma-Ferritin selbst ein Akute-Phase-Protein ist. So kann das Plasma-Ferritin im Rahmen der Inflammationsprozesse unabhängig von dem Füllungszustand der Eisenreserven des Körpers erhöht sein. Liegt dabei gleichzeitig ein Eisenmangel vor, kann dieser labordiagnostisch maskiert werden [41, 204]. So werden für CKD-Patienten höhere Plasma-Ferritin-Grenzwerte als für nierengesunde Patienten zur Eisenmangeldiagnostik vorgeschlagen, wie etwa ein Plasma-Ferritin  $< 100$  ng / ml [128].

Allerdings kann auch bei einem Plasma-Ferritin  $\geq 100$  ng / ml ein sogenannter „funktioneller Eisenmangel“ vorliegen; dieser ist charakterisiert durch normale bis überfüllte Eisenspeicher, reflektiert durch ein (hoch) normales Plasma-Ferritin, bei gleichzeitig reduzierter Verfügbarkeit

des Körpereisens für die Erythropoese und andere eisenabhängige Stoffwechselfvorgänge [17]. Hiervon abzugrenzen ist der „absolute Eisenmangel“, der als vollständige Ausschöpfung der Körpereisenspeicher mit Erniedrigung des Plasma-Ferritins definiert wird [133].

Auch der funktionelle Eisenmangel kann teilweise durch inflammatorische Prozesse erklärt werden. So kommt es bei CKD durch proinflammatorische Zytokine zu einer Induktion der hepatischen Hepcidinsynthese; die Effekte des Peptidhormons Heparidin münden langfristig in einer reduzierten intestinalen Eisenresorption einerseits und andererseits in einer Eisenretention in Hepatozyten und Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) [204]. Damit wird ein relevanter Anteil des Gesamtkörpereisens in den Eisenspeichern festgesetzt und kann dem Stoffwechsel nur noch eingeschränkt zur Verfügung gestellt werden. Das Plasma-Ferritin ist hier aufgrund der gefüllten Eisenspeicher (und gegebenenfalls aufgrund der chronischen Inflammation) normal oder erhöht, weshalb sich der „funktionelle Eisenmangel“ bei alleiniger Betrachtung des Plasma-Ferritins häufig der Standardlabordiagnostik entzieht [17, 133].

Um dennoch eine zuverlässige Erkennung des Eisenmangels bei CKD-Patienten gewährleisten zu können, empfehlen viele Leitlinien zur Anämiediagnostik bei CKD die gemeinsame Interpretation von Plasma-Ferritin und Transferrinsättigung (TSAT) [3, 5, 150]; die TSAT ist dabei ein Surrogatparameter der Verfügbarkeit des körpereigenen Eisens für die Erythropoese. Obgleich auch die TSAT durch CKD-assoziierte Inflammationsprozesse beeinflusst werden kann und gewissen (patho-) physiologischen Schwankungen unterliegt [64, 204], gilt eine TSAT < 20% als Indikator für einen absoluten und funktionellen Eisenmangel bei CKD. Darüber hinaus sind beide Laborparameter kostengünstig und breit verfügbar, und es liegen langjährige klinische Erfahrungswerte für deren Interpretation bei CKD-Patienten vor [41].

Allerdings werden auch immer wieder die Limitationen der beiden Parameter sowie die fehlende einheitliche Definition fester Grenzwerte für Patienten mit CKD diskutiert [35, 41]. Oft beziehen sich die in den Leitlinien empfohlenen Grenzwerte nur auf eine Eisenmangelanämie, nicht jedoch auf einen isolierten Eisenmangel ohne prävalente Anämie. Zwischen funktionellem und absolutem Eisenmangel wird in kaum einer Leitlinie hinsichtlich der empfohlenen Grenzwerte zur Diagnosestellung explizit differenziert. Schließlich geben einige Leitlinien anstelle einer klaren Definition eines Eisenmangels oder einer Eisenmangelanämie lediglich die Grenzwerte an, bei deren Unterschreitung eine (eisensubstituierende) Therapie indiziert ist.

**Tabelle 5** gibt einen Überblick über nationale und internationale Leitlinien großer Organisationen zu Diagnostik und Management der Anämie bei CKD. Aufgeführt sind – je nach Intention der Leitlinienempfehlung – entweder die Grenzwerte, die für die Definition eines Eisenmangels oder einer Eisenmangelanämie angegeben werden („Grenzwerte zur Diagnosestellung“) oder die Grenzwerte, ab welchen eine therapeutische Intervention (mittels Eisensubstitution) empfohlen wird („Grenzwerte zur Therapieeinleitung“) oder aber die Grenzwerte, die laut den entsprechenden Leitlinien als Zielwerte im Rahmen einer therapeutischen Intervention empfohlen werden („Grenzwerte für das Therapiemonitoring“); hierbei wird in den meisten Leitlinien zwischen der nicht-dialysepflichtigen CKD (ND-CKD) und der hämodialysepflichtigen CKD (HD-CKD) unterschieden.

Aufgrund der Heterogenität der Leitlinien darf die Darstellung in **Tabelle 5** nur als orientierend gewertet werden. Teilweise fehlt eine klare Unterscheidung zwischen Grenzwerten zur Diagnosestellung eines Eisenmangels oder einer Eisenmangelanämie von Grenzwerten zur Therapieeinleitung bei einem Eisenmangel oder einer Eisenmangelanämie. Ein (absoluter) Eisenmangel wird in drei Leitlinien eindeutig definiert: dabei definieren die UKRA (United Kingdom Renal Association) [6, 150] und die CSN (Canadian Society of Nephrology) [137] den absoluten Eisenmangel allein über das Plasma-Ferritin, während die ERBP (European Renal Best Practice) -Leitlinie [128] die Kombination von Plasma-Ferritin und TSAT zur Diagnosestellung des absoluten Eisenmangels heranzieht. Erwähnenswert ist außerdem, dass in allen Leitlinien für die Indikationsstellung zur Therapieeinleitung und als Zielwerte für das Therapiemonitoring die Kombination von Plasma-Ferritin und TSAT empfohlen wird. Die Anwendung alternativer Parameter zur Evaluation des Eisenstatus wie beispielsweise der prozentuale Anteil hypochromer Erythrozyten (Hypochromic Red Cells, % HRC) oder auch der Hämoglobingehalt von Retikulozyten (Reticulocyte haemoglobin content, CHr) wird in zwei Leitlinien als bevorzugt empfohlen (NICE (National Institute for Health and Care Excellence) [5], UKRA [6, 150]), in zwei Leitlinien als optional angegeben (KDIGO (The Kidney Disease, Improving Global Outcomes) [3], ERBP [128]) und in einer Leitlinie nicht explizit erwähnt (CSN [137]).

Im Kontext dieser uneinheitlichen und teilweise uneindeutigen Empfehlungen schlägt ein aktueller Expertenkonsens auch unter Berücksichtigung der hier dargestellten Leitlinien vor, ein Plasma-Ferritin  $< 100$  ng / ml oder eine TSAT  $< 20\%$  bei nicht-dialysepflichtiger CKD als Eisenmangel zu werten. Ein Plasma-Ferritin zwischen 100 - 300 ng / ml erfordert entsprechend der Experteneinschätzung eine Reevaluation unter Hinzuziehen der TSAT [26].

**Tabelle 5** Nationale und internationale Leitlinien zu Diagnostik und Management der Anämie bei CKD (modifiziert nach [26] & [204]).

| Organisation / Leitlinie  | Jahr            | Definierte Variable:<br>EM / EMA               | Intention der Empfehlungen   | Empfohlene Grenzwerte     |                          |                     |                       | Empfohlene Marker zur Evaluation des Eisenstatus                          |
|---|-----------------|--|--|---------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|---|
|   |                 |  |  | Plasma-Ferritin [ng / ml] |                          | TSAT [%]            |                       |   |
|   |                 |  |  | ND-CKD                    | HD-CKD                   | ND-CKD              | HD-CKD                |   |
| CSN<br>(Kanada)<br><i>Madore et al. [137]</i>   | 2008            | „Klassischer“ EM                               | Grenzwerte für die <b>Diagnosestellung</b>   | < 25 (♂)<br>< 11 (♀)      | -                        | -                   | -                     | TSAT <b>und</b> Plasma-Ferritin, weitere Parameter nicht explizit erwähnt |
|   |                 | EMA  | Grenzwerte für das <b>Therapiemonitoring</b>   | > 100                     | > 200<br>(unter ESA)     | > 20                | > 20<br>(unter ESA)   |   |
| ERBP<br>(Europa)<br><i>Locatelli et al. [128]</i>   | 2013            | Absoluter EM                                   | Grenzwerte für die <b>Diagnosestellung</b>   | < 100                     | < 100                    | < 20                | < 20                  | TSAT <b>und</b> Plasma-Ferritin, weitere Parameter optional               |
|   |                 | EMA mit absolutem EM                           | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b>   | < 100                     | < 100                    | < 20                | < 20                  |   |
|   |                 | EMA ohne absoluten EM                          | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b><br>(Ziel: Hb-Anstieg ohne ESA-Gabe)         | < 200                     | < 300                    | < 25                | < 25                  |   |
|   |                 | EMA  | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b><br>(Ziel: Hb-Anstieg / Reduktion ESA-Dosis) | < 300<br>(unter ESA)      | (< 300)<br>(unter ESA)   | < 30<br>(unter ESA) | (< 30)<br>(unter ESA) |   |
| KDIGO<br>(International)<br><i>KDIGO Anemia Work Group [3]</i>                                | 2012            | EMA  | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b>   | ≤ 500                     | ≤ 500                    | ≤ 30                | ≤ 30                  | TSAT <b>und</b> Plasma-Ferritin, weitere Parameter optional               |
| NICE<br>(Großbritannien)<br><i>National Institute for Health and Care Excellence 2015 [5]</i> | 2015            | EMA / EM<br>(keine eindeutige Differenzierung) | Grenzwerte für die <b>Diagnosestellung</b>   | < 100                     | < 100                    | < 20                | < 20                  | bevorzugt<br>% HRC, CHr<br>Alternativ: TSAT <b>und</b> Plasma-Ferritin    |
|   |                 |  | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b>   | < 100                     | < 100                    | < 20                | < 20                  |   |
|   |                 |  | Grenzwerte für das <b>Therapiemonitoring</b>   | > 100-800<br>(unter ESA)  | > 100-800<br>(unter ESA) | > 20<br>(unter ESA) | > 20<br>(unter ESA)   |   |
| UKRA<br>(Großbritannien)<br><i>United Kingdom Renal Association [6; 150]</i>                  | 2017            | Absoluter EM                                   | Grenzwerte für <b>Diagnosestellung</b>   | < 100                     | < 100                    | -                   | -                     | bevorzugt<br>% HRC, CHr<br>Alternativ: TSAT <b>und</b> Plasma-Ferritin    |
|   | Update:<br>2020 | EMA  | Grenzwerte für die <b>Therapieeinleitung</b>   | < 100                     | < 100                    | < 20                | < 20                  |   |
|   |                 | EMA  | Grenzwerte für <b>Therapiemonitoring</b>   | > 100-500                 | > 200-500                | > 20                | > 20                  |   |

**Abkürzungen:** CSN (Canadian Society of Nephrology), ERBP (European Renal Best Practice), KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes), NICE (National Institute for Health and Care Excellence), UKRA (United Kingdom Renal Association), EM / EMA (Eisenmangel / Eisenmangelanämie), ESA (Erythropoiesis-Stimulating Agent), Hb (Hämoglobinkonzentration), % HRC (Hypochromic Red Cells, prozentualer Anteil hypochromer Erythrozyten), CHr (Reticulocyte haemoglobin content, Hämoglobingehalt von Retikulozyten), ND-CKD (nicht-dialysepflichtige CKD), HD-CKD (hämodialysepflichtige CKD), TSAT (Transferrinsättigung), ♂ (wenn männlich), ♀ (wenn weiblich).

In einigen Leitlinien werden neben Plasma-Ferritin und TSAT zusätzliche oder alternative Parameter zur Diagnose des Eisenmangels bei CKD diskutiert; diese sollten dabei möglichst wenig von einer prävalenten chronischen Inflammation beeinflusst werden.

Mittlerweile gut etablierte und valide Parameter, insbesondere zur Erkennung des funktionellen Eisenmangels, sind der prozentuale Anteil hypochromer Erythrozyten (Hypochromic Red Cells, % HRC) sowie der Hämoglobingehalt von Retikulozyten (Content of reticulocyte Haemoglobin, CHr). Leider erlauben die fehlende flächendeckende Verfügbarkeit notwendiger Messverfahren und die Temperaturempfindlichkeit der Parameter, welche eine umgehende Kühlung oder eine zeitnahe Aufarbeitung der Patientenproben erfordert, deren routinemäßigen Einsatz im klinischen Alltag aus logistischen Gründen nicht überall [41, 199].

Weiterhin wurden auch schon der „lösliche Transferrin-Rezeptor“ (sTfR) beziehungsweise der sTfR-Index (sTfR / logFerritin-Index) als Alternativen zu herkömmlichen Parametern vorgeschlagen. Plasma-sTfR entsteht durch Proteolyse des Zellmembran-gebundenen Transferrin-Rezeptors (mTfR). Der mTfR reguliert die zelluläre Eisenaufnahme und wird bei gesteigertem Eisenbedarf vermehrt exprimiert. Plasma-sTfR korreliert mit der Expression des mTfR; sodass auch Plasma-sTfR bei Eisenmangel erhöht ist. Plasma-sTfR ist kein Akute-Phase-Protein und relativ unabhängig von einer prävalenten Inflammation. Dennoch ist die Bestimmung des Plasma-sTfR für die Routinediagnostik bei CKD-assoziiertem Eisenmangel ungeeignet; zum einen ist dessen Messung kostenintensiv und wird durch Alter und Ethnizität der Patienten beeinflusst und zum anderen korreliert Plasma-sTfR mit der Erythropoeseaktivität, wodurch seine Interpretation insbesondere bei CKD-Patienten, die mit Erythropoese-stimulierenden Agenzien (ESA) behandelt werden, erschwert wird [41, 204].

Vor diesem Hintergrund empfehlen nationale und internationale Leitlinien zu Diagnostik und Management der Anämie bei CKD weiterhin die Kombination von Plasma-Ferritin und TSAT zur Diagnose des Eisenmangels im klinischen Alltag [3, 128, 137], insbesondere wenn % HRC und CHr nicht bestimmt werden können [5, 150], wie es im ambulanten Umfeld oft der Fall ist.

Dementsprechend wurde in der CARE for HOME Kohorte bei allen CKD-Patienten zu Studieneinschluss das Plasma-Ferritin erfasst. Als Eisenmangel wurde leitliniengemäß ein Plasma-Ferritin < 100 ng / ml definiert. Zu Beginn der CARE for HOME Studie war die Bestimmung der TSAT allerdings nicht Teil der Einschlussuntersuchung; die TSAT-Messung wurde erst später in das Laborprotokoll aufgenommen. Somit konnte in den Auswertungen der vorgelegten Promotionsarbeit die TSAT nicht zur Diagnostik des Eisenmangels herangezogen werden. Hierdurch könnte die Anzahl der Patienten mit Eisenmangel unterschätzt worden sein.

In den Auswertungen zu CARE for HOME konnte erwartungsgemäß eine Assoziation von niedrigem Plasma-Ferritin mit erhöhtem Plasma-FGF-23 nachgewiesen werden; in univariaten Überlebensanalysen hatte die Hypoferritinämie jedoch keinerlei prognostische Bedeutung hinsichtlich renaler und kardiovaskulärer Ereignisse.

Um eine etwaige chronische Inflammation leitliniengerecht zu erfassen [3, 6, 26], wurde zusätzlich eine Subgruppenanalyse durchgeführt, in welche nur Patienten mit einem CRP (C-reaktives Protein) < 5 mg / l eingeschlossen wurden. Ziel war es den potenziellen Einfluss einer CKD-assoziierten chronischen Inflammation auszuschließen, indem in der Subgruppenanalyse ausschließlich Patienten ohne labordiagnostisch fassbare Inflammation berücksichtigt wurden.

Doch auch in den Auswertungen der Subgruppenanalyse konnte keine Assoziation von Plasma-Ferritin mit renalen oder kardiovaskulären Endpunkten bestätigt werden; daher kann ein bedeutsamer Effekt einer CKD-assoziierten chronischen Inflammation auf die hier berichteten Ergebnisse der CARE for HOME Studie ausgeschlossen werden.

## **6.4. Die mögliche prognostische Bedeutung der Interaktion zwischen einem Eisenmangel und Plasma-FGF-23 bei CKD**

Die Hypothese, dass ein Eisenmangel zur Erhöhung von Plasma-FGF-23 bei CKD beitragen kann, beruht auf epidemiologischen, experimentellen und klinisch-interventionellen Studien.

So wurde mehrfach in epidemiologischen Arbeiten ein Zusammenhang von Anämie und Eisenmangel mit erhöhtem Plasma-FGF-23 bei CKD festgestellt. Eser *et al.* beschrieben im Rahmen einer Querschnittsstudie bei einer kleinen Kohorte von 61 Peritonealdialyse-Patienten eine Assoziation von Plasma-FGF-23 sowohl mit einer Anämie als auch mit einer erniedrigten TSAT [47]. Tsai *et al.* berichteten in einer weiteren Observationsstudie bei 53 Patienten mit nicht-dialysepflichtiger CKD (Stadien 3 und 4), dass auch in ihrer Kohorte höheres Plasma-FGF-23 mit niedrigeren Hämoglobinkonzentrationen assoziiert war - diese Assoziation blieb auch nach Korrektur für potenzielle Anämie-spezifische Störvariablen erhalten [202].

Die epidemiologischen Beobachtungen dieser kleinen Kohortenstudien wurden rezent durch Nam *et al.* in der größeren prospektiven Kohortenstudie KNOW-CKD (KoreaN cohort study for Outcome in patients With Chronic Kidney Disease) bestätigt, in welcher 2089 Patienten mit einer nicht-dialysepflichtigen CKD (Stadien 1 bis 5) untersucht worden waren. Auch sie konnten zeigen, dass erhöhtes Plasma-FGF-23 mit einer prävalenten Anämie und einem Eisenmangel assoziiert war; darüber hinaus war erhöhtes Plasma-FGF-23 in der KNOW-CKD Kohorte mit der Neuentstehung einer Anämie assoziiert [156]. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen größerer Studien in westlichen Industrienationen; so wurde in der nordamerikanischen CRIC Studie bei 3869 Menschen mit einer nicht-dialysepflichtigen CKD (Stadien 2 bis 4) ebenfalls eine unabhängige Assoziation von erhöhtem Plasma-FGF-23 mit sowohl einer prävalenten als auch einer inzidenten Anämie gefunden [147].

Diese epidemiologischen Erkenntnisse stehen in Einklang mit tierexperimentellen Arbeiten, die den Einfluss eines Eisenmangels auf die Regulation von Plasma-FGF-23 und somit auf den Phosphathaushalt untersuchten. Hierbei führte in einem Mausmodell ein diätetisch induzierter Eisenmangel zu einer gesteigerten Transkription von FGF-23-mRNA in den Knochen der untersuchten Tiere. Im Blutplasma dieser gesunden Wild-Typ-Mäuse wurden daraufhin aber lediglich die enzymatischen Spaltprodukte von Plasma-FGF-23, respektive das C-terminale Plasma-FGF-23, vermehrt nachgewiesen; das biologisch aktive, intakte Plasma-FGF-23 blieb jedoch konstant und die Phosphathomöostase der Tiere somit unbeeinträchtigt. Wurde die eisenarme Diät allerdings ADHR-Knock-In-Mäusen verabreicht (ADHR, autosomal dominant

hypophosphatemic rickets, autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis), bei welchen aufgrund einer ADHR-spezifischen Genmutation die Plasma-FGF-23-Degradation beeinträchtigt ist, so führte der Eisenmangel zwar auch zu einem gewissen Anstieg des C-terminalen Plasma-FGF-23, aber primär zu einem starken Anstieg des intakten Plasma-FGF-23 und damit zu einer Hypophosphatämie durch gesteigerte Phosphaturie [52].

Es wird daher vermutet, dass ein Eisenmangel bei ansonsten gesunden Individuen zwar die Plasma-FGF-23-Synthese in Osteoblasten und Osteozyten induziert, dabei aber gleichzeitig die Plasma-FGF-23-Degradation stimuliert; somit bleibt die Gesamtmenge an biologisch aktivem, intaktem Plasma-FGF-23 stabil und es tritt keine gesteigerte Phosphaturie auf, sodass dementsprechend auch keine Hypophosphatämie beobachtet werden kann [92, 228].

Diese scheinbar physiologische Kopplung von Plasma-FGF-23-Synthese und -Degradation bei Eisenmangel kann im Rahmen verschiedener Erkrankungen beeinträchtigt sein - so auch bei Menschen mit ADHR [92]. Aufgrund einer Gain-of-Function-Mutation des FGF-23-Gens synthetisieren ADHR-Patienten ein mutiertes FGF-23-Protein, das gegenüber der Degradation durch proteolytische Spaltung in einem gewissen Umfang resistent ist [32, 185]. Tritt bei ADHR-Patienten ein Eisenmangel auf, kommt es zunächst - wie bei gesunden Menschen - zu einer gesteigerten FGF-23-mRNA-Transkription, die dann allerdings - anders als bei gesunden Menschen - nicht ausreichend durch eine gesteigerte Plasma-FGF-23-Degradation kompensiert werden kann. Hieraus resultiert ein erhöhtes, intaktes Plasma-FGF-23 im Sinne eines „genetisch determinierten“ oder „primären“ Plasma-FGF-23-Überschusses, welcher für die klassischen Merkmale der ADHR, nämlich eine massive Phosphaturie mit konsekutiver Hypophosphatämie, einen Vitamin D-Mangel und in der Folge eine Mineralisationsstörung der Knochen (Rachitis / Osteomalazie), verantwortlich ist [52, 92]. In diesem Kontext wurden mögliche pathophysiologische Parallelen der ADHR zur der CKD als dem Prototyp einer Erkrankung mit „sekundärem“ oder „reaktivem“ Plasma-FGF-23-Überschuss diskutiert. Im Verlauf der CKD steigt Plasma-FGF-23 mit Verschlechterung der Nierenfunktion an, sodass Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz bis zu 1000-fach höheres Plasma-FGF-23 als nierengesunde Menschen aufweisen [120]. Es wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass bei CKD - analog zur ADHR - eine Beeinträchtigung der Plasma-FGF-23-Degradation maßgeblich zu diesen stark erhöhten Plasma-FGF-23-Spiegeln beitragen könnte. In diesem Fall würde ein Eisenmangel auch bei CKD-Patienten durch die gesteigerte FGF-23-mRNA-Transkription in Verbindung mit der verminderten Möglichkeit zur Plasma-FGF-23-Degradation in einer starken Erhöhung von biologisch aktivem, intaktem Plasma-FGF-23 münden [230].

Zur Bestimmung von Plasma-FGF-23 existieren zwei Messverfahren; beide Messverfahren weisen mittels der ELISA-Methode das biologisch aktive, intakte Plasma-FGF-23 nach. Der Unterschied der Verfahren besteht darin, dass in dem als „C-terminalen FGF-23-ELISA“ bezeichneten Assay neben dem biologisch aktiven, intakten Plasma-FGF-23 auch dessen mutmaßlich biologisch inaktive, C-terminale Spaltprodukte nachgewiesen werden. Dementsprechend misst der C-terminale FGF-23-ELISA die Gesamtkonzentration an vorhandenem intaktem und C-terminalem Plasma-FGF-23, während der als „intakter FGF-23-ELISA“ bezeichnete Assay allein das intakte Plasma-FGF-23 nachweist [83].

Die Kenntnis der zwei unterschiedlichen Messverfahren ist deswegen von Belang, da sich bei Progression der CKD das Verhältnis von intaktem zu C-terminalem Plasma-FGF-23 zugunsten des intakten Plasma-FGF-23 verschiebt [191]. Bei Patienten mit dialysepflichtiger CKD ist folglich fast nur noch intaktes Plasma-FGF-23 nachweisbar [186], was auf eine gehemmte Plasma-FGF-23-Degradation bei fortgeschrittener CKD zurückgeführt wird [230].

Die biologische Relevanz der angeführten epidemiologischen und tierexperimentellen Daten wurde durch eine randomisierte kontrollierte Interventionsstudie belegt, die die Wirksamkeit und Sicherheit von Eisencarboxymaltose als intravenösem Eisenpräparat zur Therapie einer Eisenmangelanämie bei Frauen mit starker gynäkologischer Blutung untersuchte. Hierbei wurden nach der intravenösen Gabe von Eisencarboxymaltose transiente Veränderungen im Calcium- und Phosphatstoffwechsel beobachtet. Die Korrektur der Eisenmangelanämie sowohl mittels oraler als auch mittels intravenöser Eisengabe war dabei von einem geringgradigen Abfall des Plasma-Calciums und Serum-Kaliums, aber insbesondere von einer deutlichen, wenn auch asymptomatischen Hypophosphatämie begleitet; dieser Effekt zeigte sich bei den Patientinnen ausgeprägter, die das intravenöse Eisenpräparat erhalten hatten [211].

Diese Erkenntnisse zusammengenommen veranlassten nachfolgend Wolf *et al.* [228] den konkreten Zusammenhang zwischen dem Calcium- und Phosphatstoffwechsel und dem Eisenstoffwechsel in einer klinischen Studie gezielt zu untersuchen; hierbei wurde 55 nierengesunden Frauen mit Eisenmangelanämie aufgrund uteriner Blutungen entweder Eisencarboxymaltose oder ein Dextran-basiertes Eisenpräparat intravenös verabreicht. Vor und nach der intravenösen Eisengabe wurden Plasma-FGF-23 sowie weitere Parameter des Mineral- und Knochenstoffwechsels bestimmt. Dies erbrachte zwei wesentliche Erkenntnisse: Erstens konnte schon vor der Eisengabe zu Studienbeginn gezeigt werden, dass ein Eisenmangel bei nierengesunden Menschen - analog zu den Ergebnissen aus den tierexperimentellen Studien - mit erhöhtem C-terminalen Plasma-FGF-23 assoziiert war,

während das intakte Plasma-FGF-23 normwertig war. Der Eisenmangel hatte dabei laborchemisch keine messbaren Auswirkungen auf andere Parameter des Mineral- und Knochenstoffwechsels, wie etwa Plasma-Calcium oder Plasma-Phosphat.

Zweitens wurde gezeigt, dass innerhalb von 24 Stunden nach der intravenösen Gabe sowohl von Eisencarboxymaltose als auch des Dextran-basierten Eisenpräparats das zuvor deutlich erhöhte C-terminale Plasma-FGF-23 erwartungsgemäß abfiel. Interessanterweise zeigten die Patientinnen, die Eisencarboxymaltose erhalten hatten, zusätzlich eine passagere Erhöhung des intakten Plasma-FGF-23, was mit einer gesteigerten Phosphaturie, einer transienten Hypophosphatämie, einem Abfall des Serum-Calcitriols und im weiteren Verlauf mit einem Anstieg des Serum-Parathormons assoziiert war; derartige Veränderungen traten nach der Gabe des Dextran-basierten Eisenpräparats nicht auf.

Zusammenfassend wurde also in klinischen Studien sowohl bei nierengesunden als auch bei nierenkranken Individuen gezeigt, dass eine Eisenmangelanämie, respektive ein Eisenmangel, biologisch relevante Effekte auf Plasma-FGF-23 hat [227, 228].

Dementsprechend konnte auch in der CARE for HOME Kohorte bei Patienten mit einer CKD (Stadium 2 bis 4) die Assoziation zwischen hohem Plasma-FGF-23 und einer Hypoferritinämie als Surrogatparameter eines Eisenmangels bestätigt werden. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Korrektur für die GFR signifikant. Deshalb kann die erste Hypothese der vorliegenden Dissertation als bestätigt angesehen werden, dass - wie bei nierengesunden Menschen - auch bei Menschen mit CKD ein Eisenmangel mit erhöhtem Plasma-FGF-23 assoziiert ist.

Nachfolgend wurde die prognostische Bedeutung dieser Assoziation geprüft. Nachdem zuerst Plasma-FGF-23 als Prädiktor für kardiovaskuläre und renale Ereignisse bestätigt werden konnte, schwächte eine Korrektur für Plasma-Ferritin die Prädiktion kardiovaskulärer und renaler Ereignisse durch Plasma-FGF-23 nicht ab. Plasma-FGF-23 blieb auch nach Korrektur für die GFR und für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren stets robuster Prädiktor für kardiovaskuläre und auch renale Ereignisse. Plasma-Ferritin war dagegen zu keinem Zeitpunkt Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse; zwar war Plasma-Ferritin bei Betrachtung als kontinuierliche Variable nach Korrektur für Plasma-FGF-23 und nach zusätzlicher Korrektur für die GFR signifikant mit renalen Ereignissen assoziiert, diese Assoziation verlor sich aber nach zusätzlicher Korrektur für weitere klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Die zweite Hypothese der vorliegenden Dissertation, wonach der Eisenmangel die schlechte kardiovaskuläre und renale Prognose der CKD-Patienten mit erhöhtem Plasma-FGF-23 erklärt, muss daher als widerlegt angesehen werden.

## 6.5. Limitationen

Im Folgenden soll auf Limitationen der vorgelegten Promotionsarbeit eingegangen werden. Zunächst sind messmethodische Einschränkungen zu erwähnen: der für diese Promotionsarbeit verwendete ELISA zur Bestimmung von Plasma-FGF-23 ist ein sogenannter „C-terminaler FGF-23 ELISA“. Dieser weist sowohl biologisch aktives, intaktes Plasma-FGF-23 als auch dessen C-terminale Spaltprodukte nach. Da bei nierengesunden Menschen ein Eisenmangel die Plasma-FGF-23-Synthese einerseits sowie die Plasma-FGF-23-Degradation andererseits induziert, kommt es insgesamt zu einem Anstieg allein des C-terminalen Plasma-FGF-23, während das intakte Plasma-FGF-23 konstant bleibt [228]. Da die vorliegende Dissertation auf der Hypothese beruht, dass diese physiologische Kopplung von Plasma-FGF-23-Synthese und -Abbau bei CKD fehlreguliert ist, wäre zu erwarten, dass in der CARE for HOME Kohorte ein Eisenmangel primär mit der Erhöhung des intakten Plasma-FGF-23 assoziiert ist. Der C-terminale FGF-23 ELISA kann jedoch lediglich eine Erhöhung der Gesamtkonzentration von Plasma-FGF-23 feststellen; eine Differenzierung zwischen den C-terminalen und intakten Metaboliten und damit der Nachweis eines selektiven Anstiegs von intaktem Plasma-FGF-23 war daher nicht möglich. So kann in der vorgelegten Arbeit weder die bei CKD-Progression vorbeschriebene Verschiebung des Verhältnisses von C-terminalem hin zu intaktem Plasma-FGF-23 bestätigt werden [191], noch können die Effekte eines Eisenmangels selektiv auf C-terminales oder aber intaktes Plasma-FGF-23 nachgewiesen werden. Letzteres gelang allerdings kürzlich in einer neueren Auswertung der CARE for HOME Studie unter gleichzeitiger Verwendung eines intakten und eines C-terminalen FGF-23 ELISA. Hierbei konnte beobachtet werden, dass - entgegen der aufgestellten Hypothese - nur C-terminales Plasma-FGF-23, nicht aber intaktes Plasma-FGF-23 zu Studienbeginn mit Plasma-Ferritin korrelierte. Außerdem zeigte sich C-terminales Plasma-FGF-23 verglichen mit intaktem Plasma-FGF-23 als deutlich robuster, was die Prädiktion atherosklerotischer Ereignisse betraf [46]. Dies relativiert retrospektiv die messtechnische Limitation der hier berichteten Studienergebnisse, die sich aus der alleinigen Verwendung des C-terminalen FGF-23 ELISA ergibt. Darüber hinaus scheint das C-terminale Plasma-FGF-23 ohnehin für klinische Zwecke der zu bevorzugende Laborparameter zu sein; C-terminales Plasma-FGF-23 unterliegt nämlich - anders als intaktes Plasma-FGF-23 - kaum zirkadianen Schwankungen und zeigt eine deutlich geringere intraindividuelle Varianz. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die wahre biologische Aktivität von Plasma-FGF-23 wahrscheinlich dennoch besser durch die Verwendung des intakten Plasma-FGF-23 abgebildet werden kann, da angenommen wird, dass

C-terminales Plasma-FGF-23 keine eigenständige physiologische Funktion besitzt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass C-terminales Plasma-FGF-23 nicht vollständig biologisch inaktiv ist, sondern dass C-terminales Plasma-FGF-23 über eine Konkurrenz an den Bindungsstellen der FGF-Rezeptoren die Effekte des intakten Plasma-FGF-23 beeinflussen kann [25].

Eine weitere Limitation der Dissertation ist dem ursprünglichen Studiendesign geschuldet. Die CARE for HOME Studie wurde 2008 als prospektive Kohortenstudie initiiert. Zu dem damaligen Zeitpunkt wurde in dem standardisierten Laborprotokoll festgelegt, dass zur Evaluation des Eisenstatus lediglich Serum-Eisen und Plasma-Ferritin bestimmt werden sollten. Eine Erfassung der TSAT fand zunächst nicht statt und wurde erst später in die Labordiagnostik integriert. Somit konnten in der hier vorliegenden Arbeit Patienten mit einem Eisenmangel lediglich über Plasma-Ferritin identifiziert werden. Die meisten Leitlinien zu Diagnostik und Management der Anämie bei CKD empfehlen aber eine Kombination von Plasma-Ferritin und TSAT zur Diagnostik eines Eisenmangels. Da Plasma-Ferritin als Akute-Phase-Protein aufgrund chronischer Inflamationsprozesse bei CKD-Patienten oft erhöht ist, könnte die Zahl der Patienten mit Eisenmangel bei alleiniger Betrachtung des Plasma-Ferritins unterschätzt worden sein [3, 5, 6, 128, 137]. Wie berichtet, führte ein Ausschluss von Patienten mit erhöhtem CRP als einem Surrogatparameter einer Inflammation allerdings zu keiner relevanten Änderung der Ergebnisse.

Eine weitere mögliche Limitation der vorgelegten Promotionsarbeit ergibt sich aus rezent publizierten experimentellen Studienergebnissen. Es gibt mittlerweile Hinweise darauf, dass Plasma-FGF-23 einen bedeutsamen Einfluss auf die Erythropoese hat: Die Verabreichung von rekombinatem Plasma-FGF-23 verminderte bei Wild-Typ-Mäusen die Transkription von Erythropoetin (EPO) mRNA [36] und war mit einer Reduktion der Serum-EPO-Spiegel sowie entsprechender Verminderung der Erythropoeseaktivität assoziiert [31]. Die pharmakologische Hemmung von Plasma-FGF-23 in einem Tiermodell mit CKD resultierte wiederum in einer Steigerung der Transkription von EPO-mRNA und einem Anstieg der Serum-EPO-Spiegel; konsekutiv kam es zu einer Stimulation der Erythropoese und zu einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration [11]. Umgekehrt stimulierte im Tierexperiment sowohl erhöhtes endogenes als auch exogen zugeführtes EPO die ektope Produktion von Plasma-FGF-23 im Knochenmark sowie bei höheren Serum-EPO-Spiegeln auch in den Knochen selbst. Dies impliziert einen regulierenden Feed-Back-Mechanismus zwischen EPO, respektive der erythropoetischen Aktivität, und Plasma-FGF-23 [36, 79]. Ein aktueller Übersichtsartikel diskutiert die Hypothese, dass zumindest der funktionelle Eisenmangel die Transkription von

Plasma-FGF-23 möglicherweise eher indirekt über die EPO-Produktion beeinflussen könnte, als diese direkt zu stimulieren [171]. Da die genannten Erkenntnisse zum Zeitpunkt der Datenauswertung für diese Promotionsarbeit nicht vorlagen, wurde eine mögliche Interaktion zwischen Serum-EPO und Plasma-FGF-23 in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt beziehungsweise kann eine mögliche Interaktion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Weiterhin ist noch relevant, dass die exkretorische Nierenfunktion der Studienteilnehmer aus Gründen der Praktikabilität nicht durch direkte Messverfahren wie die Bestimmung der Inulin-Clearance oder durch nuklearmedizinische Messverfahren beurteilt, sondern indirekt mithilfe der MDRD-Formel abgeschätzt wurde. Zwar wurde nach Studienbeginn die CKD-EPI-Formel (CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) unter Verwendung von Kreatinin und gegebenenfalls zusätzlich Cystatin-C als noch präzisere Formel zur Errechnung der Nierenfunktion etabliert [122]; eine retrospektive Änderung des Studienprotokolls erfolgte jedoch bewusst nicht.

Zuletzt ist noch relevant, dass in CARE for HOME zu Studienbeginn kardiovaskuläre Ereignisse als atherosklerotische Ereignisse definiert wurden, während initial kardiale Dekompensationen nicht berücksichtigt wurden. Daher erfolgte in der vorliegenden Promotionsarbeit keine Analyse zu myokardialen Endpunkten, obgleich in der Zwischenzeit erkannt wurde, dass Plasma-FGF-23 myokardiale Ereignisse besser als atherosklerotische Ereignisse prädiziert [83, 95, 177]. Allerdings wurde auch dies im Rahmen der erwähnten, neueren CARE for HOME Auswertung explizit nachuntersucht, wobei eine mögliche Bedeutung von Plasma-Ferritin als Prädiktor myokardialer Ereignisse wie kardialer Dekompensationen postuliert wurde. In Einklang mit den Ergebnissen der hier vorgelegten Dissertation zeigte sich allerdings, dass Plasma-Ferritin sowohl in univariaten als auch in multivariaten Analysen weder atherosklerotische Ereignisse noch kardiale Dekompensationen bei Patienten mit CKD prädizierte [46].

## 6.6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte zunächst in Einklang mit dem bisherigen Stand der Forschung gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer CKD in den Stadien 2-4 eine verminderte Nierenfunktion mit erhöhten Plasma-FGF-23-Spiegeln assoziiert ist. Weiter konnte die erste Studienhypothese bestätigt werden, dass - wie bei nierengesunden Menschen auch - bei Menschen mit CKD eine Hypoferritinämie als Eisenmangelindikator mit erhöhtem Plasma-FGF-23 assoziiert ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl in univariaten Kaplan-Meier-Analysen als auch in multivariaten Cox-Regressionsanalysen mit Korrektur für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren und Parameter der Nierenfunktion erhöhtes Plasma-FGF-23, nicht aber erniedrigtes Plasma-Ferritin mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten kardiovaskulärer und renaler Ereignisse assoziiert ist. Insbesondere blieb Plasma-FGF-23 auch dann Prädiktor für kardiovaskuläre und renale Ereignisse, wenn für Plasma-Ferritin als zentralem Parameter des Eisenstatus statistisch korrigiert wurde.

Somit muss die zweite Hypothese, dass die epidemiologische Assoziation zwischen Plasma-FGF-23 und kardiovaskulären sowie renalen Ereignissen nach Korrektur für Plasma-Ferritin abgeschwächt wird, verworfen werden.

Hierdurch erscheint die bei Studienbeginn getroffene Annahme, dass die erhöhte kardiovaskuläre und renale Ereignisrate bei erhöhtem Plasma-FGF-23 kausal auf einen zugrundeliegenden Eisenmangel zurückgeführt werden kann, unwahrscheinlich; unklar bleibt allerdings, ob eine methodisch andere Detektion des Eisenmangels - etwa durch die zusätzliche Bestimmung der Transferrinsättigung - divergente Ergebnisse erbracht hätte.

Zudem kann in einer epidemiologischen Untersuchung allein eine Kausalität nicht valide nachgewiesen werden; so sollten die vielgestaltigen (patho-) physiologischen Effekte von Plasma-FGF-23 und deren prognostische Bedeutung weiterhin untersucht werden.

Zu einem besseren Verständnis könnten einerseits weitere experimentelle Arbeiten beitragen, die die kardiovaskulären Effekte von Plasma-FGF-23 untersuchen, andererseits aber auch Mendelsche Randomisationsanalysen, die die Auswirkungen einer lebenslangen Exposition gegenüber erhöhtem Plasma-FGF-23 in einem quasi-randomisierten Design überprüfen. Erst im Anschluss daran kann erwogen werden, eine medikamentöse Plasma-FGF-23-Erniedrigung mit dem Ziel der Mortalitätsreduktion bei CKD-Patienten in klinischen Studien zu untersuchen.

## 7. Literatur

1. **Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011.** (WHO/NMH/NHD/MNM/111; <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobinpdf>, accessed 30 December 2018)
2. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD–MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD–MBD).** *Kidney International* 2009, **76**:(Suppl 113): S111–S130.
3. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease.** *Kidney Inter, Suppl* 2012, **2**:279–335.
4. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.** *Kidney Inter, Suppl* 2013, **3**:1–150.
5. **National Institute for Health and Care Excellence (2015). Chronic kidney disease: managing anaemia. NICE guideline [NG8]. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng8>, Published: 3 June 2015**
6. **The Renal Association - Clinical Practice Guideline - Anemia of Chronic Kidney Disease.** <https://renalorg/sites/renalorg/files/Updated-130220-Anaemia-of-Chronic-Kidney-Disease-1-1pdf> 2017 (Update 2020).
7. **The Renal Association - Clinical Practice Guideline Anaemia of Chronic Kidney Disease Available at: <https://renalorg/wp-content/uploads/2020/02/Updated-130220-Anaemia-of-Chronic-Kidney-Disease-1-1pdf>, Final Version: June 2017, Updated: February 2020**
8. **WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.**
9. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR: **Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(2):381-387.
10. Agarwal I, Ide N, Ix JH, Kestenbaum B, Lanske B, Schiller NB, Whooley MA, Mukamal KJ: **Fibroblast growth factor-23 and cardiac structure and function.** *J Am Heart Assoc* 2014, **3**(1):e000584.
11. Agoro R, Montagna A, Goetz R, Aligbe O, Singh G, Coe LM, Mohammadi M, Rivella S, Sitara D: **Inhibition of fibroblast growth factor 23 (FGF23) signaling rescues renal anemia.** *FASEB J* 2018, **32**(7):3752-3764.
12. Andersson P, Rydberg E, Willenheimer R: **Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review.** *Eur Heart J* 2004, **25**(20):1776-1787.

13. Andrukhova O, Slavic S, Odorfer KI, Erben RG: **Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23**. *J Bone Miner Res* 2015, **30**(10):1831-1839.
14. Astor BC, Coresh J, Heiss G, Pettitt D, Sarnak MJ: **Kidney function and anemia as risk factors for coronary heart disease and mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study**. *Am Heart J* 2006, **151**(2):492-500.
15. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J: **Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994)**. *Arch Intern Med* 2002, **162**(12):1401-1408.
16. Awan AA, Walther CP, Richardson PA, Shah M, Winkelmayr WC, Navaneethan SD: **Prevalence, correlates and outcomes of absolute and functional iron deficiency anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease**. *Nephrol Dial Transplant* 2021, **36**(1):129-136.
17. Babitt JL, Lin HY: **Mechanisms of anemia in CKD**. *J Am Soc Nephrol* 2012, **23**(10):1631-1634.
18. Babitt JL, Sitara D: **Crosstalk between fibroblast growth factor 23, iron, erythropoietin, and inflammation in kidney disease**. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2019, **28**(4):304-310.
19. Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, Quigley R: **Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules**. *Kidney Int* 2005, **68**(3):1148-1153.
20. Begum S, Latunde-Dada GO: **Anemia of Inflammation with An Emphasis on Chronic Kidney Disease**. *Nutrients* 2019, **11**(10).
21. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J: **The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats**. *J Clin Invest* 2007, **117**(12):4003-4008.
22. Bhuriya R, Li S, Chen SC, McCullough PA, Bakris GL: **Plasma parathyroid hormone level and prevalent cardiovascular disease in CKD stages 3 and 4: an analysis from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP)**. *Am J Kidney Dis* 2009, **53**(4 Suppl 4):S3-10.
23. Bielez B, Reiter T, Hammerle FP, Winnicki W, Bojic M, Gleiss A, Kieweg H, Ratzinger F, Sunder-Plassmann G, Marculescu R: **The Role of Iron and Erythropoietin in the Association of Fibroblast Growth Factor 23 with Anemia in Chronic Kidney Disease in Humans**. *J Clin Med* 2020, **9**(8).
24. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM: **Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis**. *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(8):2208-2218.
25. Bouma-de Krijger A, Vervloet MG: **Fibroblast growth factor 23: are we ready to use it in clinical practice?** *J Nephrol* 2020, **33**(3):509-527.
26. Cappellini MD, Comin-Colet J, de Francisco A, Dignass A, Doehner W, Lam CS, Macdougall IC, Rogler G, Camaschella C, Kadir R *et al*: **Iron deficiency across chronic inflammatory conditions: International expert opinion on definition, diagnosis, and management**. *Am J Hematol* 2017, **92**(10):1068-1078.
27. Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong TT, Zhang Y, Yeghiazarians Y, Gardner DG: **Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy**. *Circulation* 2011, **124**(17):1838-1847.

28. Chen TK, Knicely DH, Grams ME: **Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review.** *JAMA* 2019, **322**(13):1294-1304.
29. Cho ME, Hansen JL, Peters CB, Cheung AK, Greene T, Sauer BC: **An increased mortality risk is associated with abnormal iron status in diabetic and non-diabetic Veterans with predialysis chronic kidney disease.** *Kidney Int* 2019, **96**(3):750-760.
30. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT: **Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis.** *Lancet* 2010, **375**(9731):2073-2081.
31. Coe LM, Madathil SV, Casu C, Lanske B, Rivella S, Sitara D: **FGF-23 is a negative regulator of prenatal and postnatal erythropoiesis.** *J Biol Chem* 2014, **289**(14):9795-9810.
32. Consortium A: **Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23.** *Nat Genet* 2000, **26**(3):345-348.
33. Cook JR, Dillie KS, Hakeem A, Bhatti S, Chang SM: **Effectiveness of anemia and chronic kidney disease as predictors for presence and severity of coronary artery disease in patients undergoing stress myocardial perfusion study.** *Am J Cardiol* 2008, **102**(3):266-271.
34. Czaya B, Faul C: **The Role of Fibroblast Growth Factor 23 in Inflammation and Anemia.** *Int J Mol Sci* 2019, **20**(17).
35. Daru J, Colman K, Stanworth SJ, De La Salle B, Wood EM, Pasricha SR: **Serum ferritin as an indicator of iron status: what do we need to know?** *Am J Clin Nutr* 2017, **106**(Suppl 6):1634S-1639S.
36. Daryadel A, Bettoni C, Haider T, Imenez Silva PH, Schnitzbauer U, Pastor-Arroyo EM, Wenger RH, Gassmann M, Wagner CA: **Erythropoietin stimulates fibroblast growth factor 23 (FGF23) in mice and men.** *Pflugers Arch* 2018, **470**(10):1569-1582.
37. David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, Zumbrennen-Bullough KB, Sun CC, Lin HY, Babitt JL *et al*: **Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production.** *Kidney Int* 2016, **89**(1):135-146.
38. de Jager DJ, Grootendorst DC, Jager KJ, van Dijk PC, Tomas LM, Ansell D, Collart F, Finne P, Heaf JG, De Meester J *et al*: **Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis.** *JAMA* 2009, **302**(16):1782-1789.
39. de Jager DJ, Vervloet MG, Dekker FW: **Noncardiovascular mortality in CKD: an epidemiological perspective.** *Nat Rev Nephrol* 2014, **10**(4):208-214.
40. Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Grabner A, Amaral AP, Fobker M, Stypmann J, Pavenstadt H, Wolf M, Faul C *et al*: **Treatment of established left ventricular hypertrophy with fibroblast growth factor receptor blockade in an animal model of CKD.** *Nephrol Dial Transplant* 2014, **29**(11):2028-2035.
41. Dignass A, Farrag K, Stein J: **Limitations of Serum Ferritin in Diagnosing Iron Deficiency in Inflammatory Conditions.** *Int J Chronic Dis* 2018, **2018**:9394060.
42. Eckardt KU, Scherhag A, Macdougall IC, Tsakiris D, Clyne N, Locatelli F, Zaug MF, Burger HU, Druke TB: **Left ventricular geometry predicts cardiovascular outcomes associated with anemia correction in CKD.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(12):2651-2660.

43. Edmonston D, Wojdyla D, Mehta R, Cai X, Lora C, Cohen D, Townsend RR, He J, Go AS, Kusek J *et al*: **Single Measurements of Carboxy-Terminal Fibroblast Growth Factor 23 and Clinical Risk Prediction of Adverse Outcomes in CKD.** *Am J Kidney Dis* 2019, **74**(6):771-781.
44. Eisenga MF, Minovic I, Berger SP, Kootstra-Ros JE, van den Berg E, Riphagen IJ, Navis G, van der Meer P, Bakker SJ, Gaillard CA: **Iron deficiency, anemia, and mortality in renal transplant recipients.** *Transpl Int* 2016, **29**(11):1176-1183.
45. Eisenga MF, Nolte IM, van der Meer P, Bakker SJL, Gaillard C: **Association of different iron deficiency cutoffs with adverse outcomes in chronic kidney disease.** *BMC Nephrol* 2018, **19**(1):225.
46. Emrich IE, Brandenburg V, Sellier AB, Schauerte J, Wiedenroth J, Untersteller K, Lennartz CS, Seiler-Mussler S, Wagenpfeil S, Fliser D *et al*: **Strength of Fibroblast Growth Factor 23 as a Cardiovascular Risk Predictor in Chronic Kidney Disease Weaken by ProBNP Adjustment.** *Am J Nephrol* 2019, **49**(3):203-211.
47. Eser B, Yayar O, Buyukbakkal M, Erdogan B, Ercan Z, Merhametsiz O, Haspulat A, Oguz EG, Dogan I, Canbakan B *et al*: **Fibroblast growth factor is associated to left ventricular mass index, anemia and low values of transferrin saturation.** *Nefrologia* 2015, **35**(5):465-472.
48. 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* 2010, **5**(7):1268-1276.
49. Evenepoel P, Rodriguez M, Ketteler M: **Laboratory abnormalities in CKD-MBD: markers, predictors, or mediators of disease?** *Semin Nephrol* 2014, **34**(2):151-163.
50. Evstatiev R, Gasche C: **Iron sensing and signalling.** *Gut* 2012, **61**(6):933-952.
51. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA: **Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production.** *Blood* 1992, **79**(8):1987-1994.
52. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, Robling AG, Stayrook KR, Jideonwo V, Magers MJ *et al*: **Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(46):E1146-1155.
53. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutierrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM *et al*: **FGF23 induces left ventricular hypertrophy.** *J Clin Invest* 2011, **121**(11):4393-4408.
54. Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, Chae DW, Chevaile A, Cobbe SM, Gronhagen-Riska C *et al*: **Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis.** *N Engl J Med* 2009, **360**(14):1395-1407.
55. Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM: **Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2009, **4**(1):57-61.
56. Fishbane S, Spinowitz B: **Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018.** *Am J Kidney Dis* 2018, **71**(3):423-435.
57. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F, Group MS, Kuen E *et al*: **Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts**

- progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study.** *J Am Soc Nephrol* 2007, **18**(9):2600-2608.
58. Floege J: **Phosphate binders in chronic kidney disease: an updated narrative review of recent data.** *J Nephrol* 2020, **33**(3):497-508.
  59. Flügge F: **Adiponektin-Subfraktionen und kardiovaskuläre Morbidität bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung** 2011.
  60. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE: **Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy.** *Kidney Int* 1995, **47**(1):186-192.
  61. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE: **The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease.** *Am J Kidney Dis* 1996, **28**(1):53-61.
  62. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: **Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease.** *J Am Soc Nephrol* 1998, **9**(12 Suppl):S16-23.
  63. Folsom AR, Alonso A, Misialek JR, Michos ED, Selvin E, Eckfeldt JH, Coresh J, Pankow JS, Lutsey PL: **Parathyroid hormone concentration and risk of cardiovascular diseases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.** *Am Heart J* 2014, **168**(3):296-302.
  64. Formanowicz D, Formanowicz P: **Transferrin changes in haemodialysed patients.** *Int Urol Nephrol* 2012, **44**(3):907-919.
  65. Frazer DM, Anderson GJ: **Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **289**(4):G631-635.
  66. Fuernau G, Poss J, Denks D, Desch S, Heine GH, Eitel I, Seiler S, de Waha S, Ewen S, Link A *et al*: **Fibroblast growth factor 23 in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: a biomarker substudy of the Intraaortic Balloon Pump in Cardiogenic Shock II (IABP-SHOCK II) trial.** *Crit Care* 2014, **18**(6):713.
  67. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T: **Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease.** *Kidney Int* 2010, **77**(3):211-218.
  68. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK: **Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients.** *J Am Soc Nephrol* 2001, **12**(10):2131-2138.
  69. Ganz T: **Systemic iron homeostasis.** *Physiol Rev* 2013, **93**(4):1721-1741.
  70. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY: **Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization.** *N Engl J Med* 2004, **351**(13):1296-1305.
  71. Go AS, Yang J, Ackerson LM, Lepper K, Robbins S, Massie BM, Shlipak MG: **Hemoglobin level, chronic kidney disease, and the risks of death and hospitalization in adults with chronic heart failure: the Anemia in Chronic Heart Failure: Outcomes and Resource Utilization (ANCHOR) Study.** *Circulation* 2006, **113**(23):2713-2723.

72. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J: **Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.** *Drug Discov Today* 2005, **10**(4):267-273.
73. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V *et al*: **Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy.** *Cell Metab* 2015, **22**(6):1020-1032.
74. Gregg LP, Hedayati SS: **Management of Traditional Cardiovascular Risk Factors in CKD: What Are the Data?** *Am J Kidney Dis* 2018, **72**(5):728-744.
75. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA: **Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter.** *Nature* 1997, **388**(6641):482-488.
76. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M: **Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(7):2205-2215.
77. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R *et al*: **Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease.** *Circulation* 2009, **119**(19):2545-2552.
78. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H *et al*: **Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis.** *N Engl J Med* 2008, **359**(6):584-592.
79. Hanudel MR, Eisenga MF, Rappaport M, Chua K, Qiao B, Jung G, Gabayan V, Gales B, Ramos G, de Jong MA *et al*: **Effects of erythropoietin on fibroblast growth factor 23 in mice and humans.** *Nephrol Dial Transplant* 2019, **34**(12):2057-2065.
80. Hanudel MR, Rappaport M, Chua K, Gabayan V, Qiao B, Jung G, Salusky IB, Ganz T, Nemeth E: **Levels of the erythropoietin-responsive hormone erythroferrone in mice and humans with chronic kidney disease.** *Haematologica* 2018, **103**(4):e141-e142.
81. Heine GH: **Mineral metabolism in heart disease.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015, **24**(4):310-316.
82. Heine GH, Nangaku M, Fliser D: **Calcium and phosphate impact cardiovascular risk.** *Eur Heart J* 2013, **34**(15):1112-1121.
83. Heine GH, Seiler S, Fliser D: **FGF-23: the rise of a novel cardiovascular risk marker in CKD.** *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**(8):3072-3081.
84. Herath E: **Ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung renaler und lienaler Widerstandsindices eine selektive Beurteilung der chronischen Nierenschädigung?** 2011.
85. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD: **Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis.** *PLoS One* 2016, **11**(7):e0158765.
86. Hofman-Bang J, Martuseviciene G, Santini MA, Olgaard K, Lewin E: **Increased parathyroid expression of klotho in uremic rats.** *Kidney Int* 2010, **78**(11):1119-1127.
87. Hou YC, Liu WC, Zheng CM, Zheng JQ, Yen TH, Lu KC: **Role of Vitamin D in Uremic Vascular Calcification.** *Biomed Res Int* 2017, **2017**:2803579.

88. Hruska KA, Sugatani T, Agapova O, Fang Y: **The chronic kidney disease - Mineral bone disorder (CKD-MBD): Advances in pathophysiology.** *Bone* 2017, **100**:80-86.
89. Hsu CY, McCulloch CE, Curhan GC: **Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13**(2):504-510.
90. Hussein S, Prieto J, O'Shea M, Hoffbrand AV, Baillood RA, Moorhead JF: **Serum ferritin assay and iron status in chronic renal failure and haemodialysis.** *Br Med J* 1975, **1**(5957):546-548.
91. Iimori S, Naito S, Noda Y, Nishida H, Kihira H, Yui N, Okado T, Sasaki S, Uchida S, Rai T: **Anaemia management and mortality risk in newly visiting patients with chronic kidney disease in Japan: The CKD-ROUTE study.** *Nephrology (Carlton)* 2015, **20**(9):601-608.
92. Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ: **Iron modifies plasma FGF23 differently in autosomal dominant hypophosphatemic rickets and healthy humans.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(11):3541-3549.
93. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutierrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J *et al*: **Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease.** *Kidney Int* 2011, **79**(12):1370-1378.
94. Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, Wahl P, Gutierrez OM, Steigerwalt S, He J *et al*: **Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease.** *JAMA* 2011, **305**(23):2432-2439.
95. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, de Boer IH, Chonchol M, Mukamal KJ, Rifkin D, Siscovick DS, Sarnak MJ, Shlipak MG: **Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study).** *J Am Coll Cardiol* 2012, **60**(3):200-207.
96. Jager KJ, Lindholm B, Goldsmith D, Fliser D, Wiecek A, Suleymanlar G, Ortiz A, Massy Z, Martinez-Castelao A, Agarwal R *et al*: **Cardiovascular and non-cardiovascular mortality in dialysis patients: where is the link?** *Kidney Int Suppl (2011)* 2011, **1**(1):21-23.
97. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M: **Early recognition and prevention of chronic kidney disease.** *Lancet* 2010, **375**(9722):1296-1309.
98. Jelkmann W: **Physiology and pharmacology of erythropoietin.** *Transfus Med Hemother* 2013, **40**(5):302-309.
99. Jelkmann W: **Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production.** *J Interferon Cytokine Res* 1998, **18**(8):555-559.
100. Jimbo R, Shimosawa T: **Cardiovascular Risk Factors and Chronic Kidney Disease-FGF23: A Key Molecule in the Cardiovascular Disease.** *Int J Hypertens* 2014, **2014**:381082.
101. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: **Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.** *Circ Res* 2000, **87**(7):E10-17.

102. Josephy PD, Eling T, Mason RP: **The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates.** *J Biol Chem* 1982, **257**(7):3669-3675.
103. Junarta J, Jha V, Banerjee D: **Insight into the impact of vitamin D on cardiovascular outcomes in chronic kidney disease.** *Nephrology (Carlton)* 2019, **24**(8):781-790.
104. Kalantar-Zadeh K, Hoffken B, Wunsch H, Fink H, Kleiner M, Luft FC: **Diagnosis of iron deficiency anemia in renal failure patients during the post-erythropoietin era.** *Am J Kidney Dis* 1995, **26**(2):292-299.
105. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS, McAllister CJ, Budoff MJ, Salusky IB, Kopple JD: **Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients.** *Kidney Int* 2006, **70**(4):771-780.
106. Kanamori Y, Murakami M, Sugiyama M, Hashimoto O, Matsui T, Funaba M: **Interleukin-1beta (IL-1beta) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) expression in hepatocytes.** *J Biol Chem* 2017, **292**(24):10275-10287.
107. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T: **Author Correction: Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism.** *Nat Genet* 2020, **52**(4):463.
108. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T: **Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism.** *Nat Genet* 2014, **46**(7):678-684.
109. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, Smits G, Chonchol M, Investigators H: **FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis.** *J Am Soc Nephrol* 2011, **22**(10):1913-1922.
110. Ketteler M, Biggar PH: **Review article: Getting the balance right: assessing causes and extent of vascular calcification in chronic kidney disease.** *Nephrology (Carlton)* 2009, **14**(4):389-394.
111. Kim JY, Lee Y, Kang HG, Ha IS, Cheong HI, Choi HJ, Han KH, Kim SH, Cho MH, Shin JI *et al*: **Left-ventricular diastolic dysfunction in Korean children with chronic kidney disease: data from the KNOW-Ped CKD study.** *BMC Nephrol* 2020, **21**(1):533.
112. Koury MJ, Haase VH: **Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy.** *Nat Rev Nephrol* 2015, **11**(7):394-410.
113. Kovesdy CP, Estrada W, Ahmadzadeh S, Kalantar-Zadeh K: **Association of markers of iron stores with outcomes in patients with nondialysis-dependent chronic kidney disease.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2009, **4**(2):435-441.
114. Kovesdy CP, Trivedi BK, Kalantar-Zadeh K, Anderson JE: **Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease.** *Kidney Int* 2006, **69**(3):560-564.
115. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE: **Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells.** *J Endocrinol* 2007, **195**(1):125-131.
116. Krantz SB: **Erythropoietin.** *Blood* 1991, **77**(3):419-434.

117. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK: **Identification of the haemoglobin scavenger receptor.** *Nature* 2001, **409**(6817):198-201.
118. Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakhri S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT: **Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1).** *Br J Nutr* 2009, **101**(8):1150-1156.
119. Lankhorst CE, Wish JB: **Anemia in renal disease: diagnosis and management.** *Blood Rev* 2010, **24**(1):39-47.
120. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner 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* 2003, **64**(6):2272-2279.
121. Levey AS, Astor BC, Stevens LA, Coresh J: **Chronic kidney disease, diabetes, and hypertension: what's in a name?** *Kidney Int* 2010, **78**(1):19-22.
122. Levey AS, Stevens LA: **Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions.** *Am J Kidney Dis* 2010, **55**(4):622-627.
123. Levin A: **Anemia and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease populations: a review of the current state of knowledge.** *Kidney Int Suppl* 2002(80):35-38.
124. Levin A, Stevens PE: **Early detection of CKD: the benefits, limitations and effects on prognosis.** *Nat Rev Nephrol* 2011, **7**(8):446-457.
125. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM: **Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(2):321-326.
126. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, Hsiao LL: **Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23.** *Circulation* 2012, **125**(18):2243-2255.
127. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD: **Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(5):1305-1315.
128. Locatelli F, Barany P, Covic A, De Francisco A, Del Vecchio L, Goldsmith D, Horl W, London G, Vanholder R, Van Biesen W *et al*: **Kidney Disease: Improving Global Outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease: a European Renal Best Practice position statement.** *Nephrol Dial Transplant* 2013, **28**(6):1346-1359.
129. Locatelli F, Pisoni RL, Akizawa T, Cruz JM, DeOreo PB, Lameire NH, Held PJ: **Anemia management for hemodialysis patients: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) guidelines and Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS) findings.** *Am J Kidney Dis* 2004, **44**(5 Suppl 2):27-33.
130. Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, del Vecchio L: **Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease.** *Nephrol Dial Transplant* 2003, **18** Suppl 7:vii2-9.

131. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC: **Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro.** *Kidney Int* 2006, **69**(8):1464-1470.
132. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, Klag MJ: **Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13**(7):1918-1927.
133. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L: **Iron deficiency anaemia.** *Lancet* 2016, **387**(10021):907-916.
134. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G: **Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells.** *Blood* 2003, **101**(10):4148-4154.
135. Lutsey PL, Alonso A, Selvin E, Pankow JS, Michos ED, Agarwal SK, Loehr LR, Eckfeldt JH, Coresh J: **Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure, and cardiovascular mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities study.** *J Am Heart Assoc* 2014, **3**(3):e000936.
136. Mace ML, Gravesen E, Nordholm A, Olgaard K, Lewin E: **Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 Regulates the Plasma Levels of Parathyroid Hormone In Vivo Through the FGF Receptor in Normocalcemia, But Not in Hypocalcemia.** *Calcif Tissue Int* 2018, **102**(1):85-92.
137. Madore F, White CT, Foley RN, Barrett BJ, Moist LM, Klarenbach SW, Culleton BF, Tonelli M, Manns BJ, Canadian Society of N: **Clinical practice guidelines for assessment and management of iron deficiency.** *Kidney Int Suppl* 2008(110):S7-S11.
138. Mann MC, Hobbs AJ, Hemmelgarn BR, Roberts DJ, Ahmed SB, Rabi DM: **Effect of oral vitamin D analogs on mortality and cardiovascular outcomes among adults with chronic kidney disease: a meta-analysis.** *Clin Kidney J* 2015, **8**(1):41-48.
139. Marks A, Macleod C, McAteer A, Murchie P, Fluck N, Smith WC, Prescott GJ, Clark LE, Ali T, Black C: **Chronic kidney disease, a useful trigger for proactive primary care? Mortality results from a large U.K. cohort.** *Fam Pract* 2013, **30**(3):282-289.
140. Matsui I, Oka T, Kusunoki Y, Mori D, Hashimoto N, Matsumoto A, Shimada K, Yamaguchi S, Kubota K, Yonemoto S *et al*: **Cardiac hypertrophy elevates serum levels of fibroblast growth factor 23.** *Kidney Int* 2018, **94**(1):60-71.
141. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, Tse TF, Wasserman B, Leiserowitz M: **The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease.** *Curr Med Res Opin* 2004, **20**(9):1501-1510.
142. McCullough PA, Chan CT, Weinhandl ED, Burkart JM, Bakris GL: **Intensive Hemodialysis, Left Ventricular Hypertrophy, and Cardiovascular Disease.** *Am J Kidney Dis* 2016, **68**(5S1):S5-S14.
143. McGonigle RJ, Wallin JD, Shaddock RK, Fisher JW: **Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency.** *Kidney Int* 1984, **25**(2):437-444.
144. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A *et al*: **An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron.** *Science* 2001, **291**(5509):1755-1759.
145. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F *et al*: **A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation.** *Mol Cell* 2000, **5**(2):299-309.

146. Means RT, Jr.: **Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia.** *Stem Cells* 1995, **13**(1):32-37.
147. Mehta R, Cai X, Hodakowski A, Lee J, Leonard M, Ricardo A, Chen J, Hamm L, Sondheimer J, Dobre M *et al*: **Fibroblast Growth Factor 23 and Anemia in the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2017, **12**(11):1795-1803.
148. Meisinger C, Doring A, Lowel H, Group KS: **Chronic kidney disease and risk of incident myocardial infarction and all-cause and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women from the general population.** *Eur Heart J* 2006, **27**(10):1245-1250.
149. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B: **25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population.** *Arch Intern Med* 2008, **168**(15):1629-1637.
150. Mikhail A, Brown C, Williams JA, Mathrani V, Shrivastava R, Evans J, Isaac H, Bhandari S: **Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease.** *BMC Nephrol* 2017, **18**(1):345.
151. Modi ZJ, Lu Y, Ji N, Kapke A, Selewski DT, Dietrich X, Abbott K, Nallamotheu BK, Schaubel DE, Saran R *et al*: **Risk of Cardiovascular Disease and Mortality in Young Adults With End-stage Renal Disease: An Analysis of the US Renal Data System.** *JAMA Cardiol* 2019, **4**(4):353-362.
152. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G *et al*: **Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).** *Kidney Int* 2006, **69**(11):1945-1953.
153. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, Kubo Y, Block GA, Correa-Rotter R, Drueke TB, Herzog CA, London GM, Mahaffey KW *et al*: **Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial.** *Circulation* 2015, **132**(1):27-39.
154. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW: **Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network.** *Annu Rev Nutr* 2008, **28**:197-213.
155. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B: **A Red Carpet for Iron Metabolism.** *Cell* 2017, **168**(3):344-361.
156. Nam KH, Kim H, An SY, Lee M, Cha MU, Park JT, Yoo TH, Lee KB, Kim YH, Sung SA *et al*: **Circulating Fibroblast Growth Factor-23 Levels are Associated with an Increased Risk of Anemia Development in Patients with Nondialysis Chronic Kidney Disease.** *Sci Rep* 2018, **8**(1):7294.
157. National Kidney Foundation: **K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.** *Am J Kidney Dis* 2002, **39**(Suppl 1):S1-S266.
158. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T: **IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin.** *J Clin Invest* 2004, **113**(9):1271-1276.

159. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J: **Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization.** *Science* 2004, **306**(5704):2090-2093.
160. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T: **Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein.** *Blood* 2003, **101**(7):2461-2463.
161. Nitta K, Akiba T, Uchida K, Otsubo S, Otsubo Y, Takei T, Ogawa T, Yumura W, Kabaya T, Nihei H: **Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients.** *Hypertens Res* 2004, **27**(1):47-52.
162. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, Proctor BM, Petty M, Chen Z, Schechtman KB *et al*: **1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Circulation* 2009, **120**(8):687-698.
163. Palmer SC, Gardner S, Tonelli M, Mavridis D, Johnson DW, Craig JC, French R, Ruospo M, Strippoli GF: **Phosphate-Binding Agents in Adults With CKD: A Network Meta-analysis of Randomized Trials.** *Am J Kidney Dis* 2016, **68**(5):691-702.
164. Palsson R, Patel UD: **Cardiovascular complications of diabetic kidney disease.** *Adv Chronic Kidney Dis* 2014, **21**(3):273-280.
165. Paoletti E, De Nicola L, Gabbai FB, Chiodini P, Ravera M, Pieracci L, Marre S, Cassottana P, Luca S, Vettoretti S *et al*: **Associations of Left Ventricular Hypertrophy and Geometry with Adverse Outcomes in Patients with CKD and Hypertension.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2016, **11**(2):271-279.
166. Papademetriou V, Zaheer M, Doumas M, Lovato L, Applegate WB, Tsioufis C, Mottle A, Punthakee Z, Cushman WC, Group AS: **Cardiovascular Outcomes in Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes: Impact of Blood Pressure Level and Presence of Kidney Disease.** *Am J Nephrol* 2016, **43**(4):271-280.
167. Portoles J, Lopez-Gomez JM, Aljama P: **A prospective multicentre study of the role of anaemia as a risk factor in haemodialysis patients: the MAR Study.** *Nephrol Dial Transplant* 2007, **22**(2):500-507.
168. Poss J, Mahfoud F, Seiler S, Heine GH, Fliser D, Bohm M, Link A: **FGF-23 is associated with increased disease severity and early mortality in cardiogenic shock.** *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2013, **2**(3):211-218.
169. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID: **Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption.** *Cell* 2006, **127**(5):917-928.
170. Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, Schmid R: **Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase.** *J Clin Invest* 1974, **54**(6):1344-1352.
171. Ratsma DMA, Zillikens MC, van der Eerden BCJ: **Upstream Regulators of Fibroblast Growth Factor 23.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021, **12**:588096.
172. Ravani P, Malberti F, Tripepi G, Pecchini P, Cutrupi S, Pizzini P, Mallamaci F, Zoccali C: **Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease.** *Kidney Int* 2009, **75**(1):88-95.

173. Richter M, Polyakova V, Gajawada P, Pöling J, Warnecke H, Braun T, Walther T, Kubin T: **Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes.** *J Clin Exp Cardiol* 2012:S9-003.
174. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW: **Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**(5):420-426.
175. Sarnak MJ: **Cardiovascular complications in chronic kidney disease.** *Am J Kidney Dis* 2003, **41**(5 Suppl):11-17.
176. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ *et al*: **Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention.** *Circulation* 2003, **108**(17):2154-2169.
177. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Anderson AH, Isakova T, Ojo A, Zhang X, Nessel L, Hamano T, Grunwald JE *et al*: **Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD.** *J Am Soc Nephrol* 2014, **25**(2):349-360.
178. Seeherunvong W, Abitbol CL, Chandar J, Rusconi P, Zilleruelo GE, Freundlich M: **Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in children on dialysis.** *Pediatr Nephrol* 2012, **27**(11):2129-2136.
179. Seiler S, Heine GH, Fliser D: **Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease.** *Kidney Int Suppl* 2009(114):S34-42.
180. 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* 2010, **25**(12):3983-3989.
181. Seiler S, Rogacev KS, Roth HJ, Shafein P, Emrich I, Neuhaus S, Floege J, Fliser D, Heine GH: **Associations of FGF-23 and sKlotho with cardiovascular outcomes among patients with CKD stages 2-4.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2014, **9**(6):1049-1058.
182. Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, Davis J, Stevens J, Bi V, Renshaw L, Hawkins N, Wang W, Chen C *et al*: **FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality.** *J Clin Invest* 2012, **122**(7):2543-2553.
183. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC *et al*: **Identification of an intestinal heme transporter.** *Cell* 2005, **122**(5):789-801.
184. 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* 2004, **19**(3):429-435.
185. 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* 2002, **143**(8):3179-3182.
186. Shimada T, Urakawa I, Isakova T, Yamazaki Y, Epstein M, Wesseling-Perry K, Wolf M, Salusky IB, Juppner H: **Circulating fibroblast growth factor 23 in patients with**

- end-stage renal disease treated by peritoneal dialysis is intact and biologically active.** *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**(2):578-585.
187. Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, Bleyer A, Newman A, Siscovick D, Psaty B: **Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors.** *JAMA* 2005, **293**(14):1737-1745.
  188. Shroff R, Long DA, Shanahan C: **Mechanistic insights into vascular calcification in CKD.** *J Am Soc Nephrol* 2013, **24**(2):179-189.
  189. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y *et al*: **Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(7):1504-1512.
  190. Slavic S, Ford K, Modert M, Becirovic A, Handschuh S, Baierl A, Katica N, Zeitz U, Erben RG, Andrukhova O: **Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):11298.
  191. Smith ER, Cai MM, McMahon LP, Holt SG: **Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurements.** *J Clin Endocrinol Metab* 2012, **97**(9):3357-3365.
  192. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S *et al*: **Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis.** *J Am Soc Nephrol* 2013, **24**(10):1599-1616.
  193. Stauffer ME, Fan T: **Prevalence of anemia in chronic kidney disease in the United States.** *PLoS One* 2014, **9**(1):e84943.
  194. Stohr R, Schuh A, Heine GH, Brandenburg V: **FGF23 in Cardiovascular Disease: Innocent Bystander or Active Mediator?** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018, **9**:351.
  195. Takashi Y, Kinoshita Y, Hori M, Ito N, Taguchi M, Fukumoto S: **Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy.** *Endocr Res* 2017, **42**(2):132-137.
  196. Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB: **Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells.** *Blood* 1997, **90**(6):2244-2252.
  197. Taylor EN, Rimm EB, Stampfer MJ, Curhan GC: **Plasma fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, phosphorus, and risk of coronary heart disease.** *Am Heart J* 2011, **161**(5):956-962.
  198. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL *et al*: **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* 2008, **52**(3):519-530.
  199. Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I, British Committee for Standards in H: **Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency.** *Br J Haematol* 2013, **161**(5):639-648.
  200. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFftUDoMI, Katus HA, Lindahl B, Morrow DA *et al*: **Third universal definition of myocardial infarction.** *Circulation* 2012, **126**(16):2020-2035.

201. 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* 2004, **279**(11):9777-9784.
202. Tsai MH, Leu JG, Fang YW, Liou HH: **High Fibroblast Growth Factor 23 Levels Associated With Low Hemoglobin Levels in Patients With Chronic Kidney Disease Stages 3 and 4.** *Medicine (Baltimore)* 2016, **95**(11):e3049.
203. Tuttle KR, Alicic RZ, Duru OK, Jones CR, Daratha KB, Nicholas SB, McPherson SM, Neumiller JJ, Bell DS, Mangione CM *et al*: **Clinical Characteristics of and Risk Factors for Chronic Kidney Disease Among Adults and Children: An Analysis of the CURE-CKD Registry.** *JAMA Netw Open* 2019, **2**(12):e1918169.
204. Ueda N, Takasawa K: **Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease.** *Nutrients* 2018, **10**(9).
205. Uehata T, Tomosugi N, Shoji T, Sakaguchi Y, Suzuki A, Kaneko T, Okada N, Yamamoto R, Nagasawa Y, Kato K *et al*: **Serum hepcidin-25 levels and anemia in non-dialysis chronic kidney disease patients: a cross-sectional study.** *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**(3):1076-1083.
206. Uhlig K, Levey AS, Sarnak MJ: **Traditional cardiac risk factors in individuals with chronic kidney disease.** *Semin Dial* 2003, **16**(2):118-127.
207. United States Renal Data System: **2017 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States.** *National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, Bethesda, MD, 2017.
208. United States Renal Data System: **2018 USRDS Annual Data Report, Epidemiology of kidney disease in the United States.** *National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*,. *Bethesda, MD, 2018*, available at: [https://www.usrds.org/media/1730/v2\\_c05\\_mortality\\_18\\_usrds.pdf](https://www.usrds.org/media/1730/v2_c05_mortality_18_usrds.pdf)
209. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.** *Nature* 2006, **444**(7120):770-774.
210. Vaidya A, Forman JP: **Vitamin D and hypertension: current evidence and future directions.** *Hypertension* 2010, **56**(5):774-779.
211. Van Wyck DB, Mangione A, Morrison J, Hadley PE, Jehle JA, Goodnough LT: **Large-dose intravenous ferric carboxymaltose injection for iron deficiency anemia in heavy uterine bleeding: a randomized, controlled trial.** *Transfusion* 2009, **49**(12):2719-2728.
212. Vervloet M, Cozzolino M: **Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall?** *Kidney Int* 2017, **91**(4):808-817.
213. Vogt I, Haffner D, Leifheit-Nestler M: **FGF23 and Phosphate-Cardiovascular Toxins in CKD.** *Toxins (Basel)* 2019, **11**(11).
214. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ: **Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse.** *Nat Genet* 1999, **21**(2):195-199.
215. Walker AM, Schneider G, Yeaw J, Nordstrom B, Robbins S, Pettitt D: **Anemia as a predictor of cardiovascular events in patients with elevated serum creatinine.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(8):2293-2298.

216. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA: **The role of macrophages in the regulation of erythroid colony growth in vitro.** *Blood* 1992, **80**(7):1702-1709.
217. Wang CY, Babitt JL: **Liver iron sensing and body iron homeostasis.** *Blood* 2019, **133**(1):18-29.
218. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasani RS: **Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease.** *Circulation* 2008, **117**(4):503-511.
219. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P: **Chronic Kidney Disease.** *Lancet* 2017, **389**(10075):1238-1252.
220. Weihrauch A: **Sind renale Widerstandsindices nierenspezifische Ultraschallparameter? - Detektion der linksventrikulären diastolischen Dysfunktion als weiteren extrarenalen Einflussfaktor.** 2011.
221. Weiner DE, Tighiouart H, Vlagopoulos PT, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, Sarnak MJ: **Effects of anemia and left ventricular hypertrophy on cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(6):1803-1810.
222. Weiss G, Goodnough LT: **Anemia of chronic disease.** *N Engl J Med* 2005, **352**(10):1011-1023.
223. Wheeler DC, London GM, Parfrey PS, Block GA, Correa-Rotter R, Dehmel B, Drueke TB, Floege J, Kubo Y, Mahaffey KW *et al*: **Effects of cinacalcet on atherosclerotic and nonatherosclerotic cardiovascular events in patients receiving hemodialysis: the EVALUATION Of Cinacalcet HCl Therapy to Lower CardioVascular Events (EVOLVE) trial.** *J Am Heart Assoc* 2014, **3**(6):e001363.
224. 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* 2001, **60**(6):2079-2086.
225. WHO: **Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations.** *Vitamin and Mineral Nutrition Information System Geneva, World Health Organization* 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.2)([http://www.who.int/vmnis/indicators/serum\\_ferritin.pdf](http://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin.pdf)).
226. Wilkinson N, Pantopoulos K: **The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models.** *Front Pharmacol* 2014, **5**:176.
227. Wolf M, Chertow GM, Macdougall IC, Kaper R, Krop J, Strauss W: **Randomized trial of intravenous iron-induced hypophosphatemia.** *JCI Insight* 2018, **3**(23).
228. Wolf M, Koch TA, Bregman DB: **Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women.** *J Bone Miner Res* 2013, **28**(8):1793-1803.
229. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo CA, Jr., Tonelli M *et al*: **Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients.** *Kidney Int* 2007, **72**(8):1004-1013.
230. Wolf M, White KE: **Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014, **23**(4):411-419.

231. Xie J, Yoon J, An SW, Kuro-o M, Huang CL: **Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate.** *J Am Soc Nephrol* 2015, **26**(5):1150-1160.
232. Yamamoto T, Miyazaki M, Nakayama M, Yamada G, Matsushima M, Sato M, Sato T, Taguma Y, Sato H, Ito S: **Impact of hemoglobin levels on renal and non-renal clinical outcomes differs by chronic kidney disease stages: the Gonryo study.** *Clin Exp Nephrol* 2016, **20**(4):595-602.
233. Yamashita T: **Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23.** *Ther Apher Dial* 2005, **9**(4):313-318.
234. Yanochko GM, Vitsky A, Heyen JR, Hirakawa B, Lam JL, May J, Nichols T, Sace F, Trajkovic D, Blasi E: **Pan-FGFR inhibition leads to blockade of FGF23 signaling, soft tissue mineralization, and cardiovascular dysfunction.** *Toxicol Sci* 2013, **135**(2):451-464.
235. Yildiz A, Memisoglu E, Oflaz H, Yazici H, Pusuroglu H, Akkaya V, Erzengin F, Tepe S: **Atherosclerosis and vascular calcification are independent predictors of left ventricular hypertrophy in chronic haemodialysis patients.** *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**(4):760-767.
236. Zannad F, Kessler M, Leheret P, Grunfeld JP, Thuilliez C, Leizorovicz 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* 2006, **70**(7):1318-1324.

## 8. Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen bedanken, die zu der Entstehung und dem Gelingen der vorliegenden Promotionsarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Danilo Fliser als Direktor der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes (im Folgenden UKS) für die Möglichkeit, die vorliegende Promotionsarbeit unter seiner Leitung verfassen zu dürfen. Ohne seine Bereitschaft, mir die Implementation meiner Promotionsarbeit in die Arbeit des Laborteams der Klinik für Innere Medizin IV des UKS zu erlauben, wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken.

Den größten Anteil am Gelingen der Arbeit hatte Herr Prof. Dr. Gunnar Heine, der mir mit seinem Rat stets verständnisvoll zur Seite stand. Seine Offenheit und Freundlichkeit machten es möglich jederzeit Fragen zu stellen oder Probleme zu diskutieren, bis eine adäquate Lösung erreicht werden konnte. Insbesondere für seinen dabei gezeigten Langmut und seine Geduld gebührt ihm mein aufrichtiger Dank.

Weiterhin schulde ich den Mitarbeitenden der nephrologischen Ambulanz meinen Dank. Allen voran bedanke ich mich bei der medizinisch-technischen Assistentin Frau Marie Blinn, die mich in studienrelevanten Angelegenheiten angeleitet und mir - auch über die Promotionsarbeit hinaus - wichtige Kenntnisse im Bereich der Sonographie vermittelt hat. Ebenso bedanke ich mich bei den in der Ambulanz tätigen Krankenschwestern, durch deren Verständnis ein reibungsloser Studienablauf inmitten des hektischen Klinikalltags möglich wurde. Auch Frau Anette Offenhäuser als zentraler Ansprechpartnerin des nephrologischen Sekretariats gilt mein herzlicher Dank. Durch ihr organisatorisches Talent und ihre freundliche Art war sie insbesondere bei koordinatorischen Aufgaben eine große Hilfe bei so mancher Problemlösung.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Lisa Schulligen als wissenschaftlicher Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe 1 der Klinik für Innere Medizin IV des UKS für Ihre Bereitschaft, mich in den ersten Wochen meiner Promotionsarbeit vorrangig in Bezug auf die Literaturrecherche zu unterstützen.

Die vorliegende Dissertation steht in einer Reihe von Promotionsarbeiten, die im Kontext des globalen epidemiologischen „CKD-PC“ Projektes in der Arbeitsgruppe 1 der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten - des UKS entstanden. Insbesondere schließt sie an vorherige Dissertationsarbeiten an, die bis Oktober 2014 im Rahmen der

CARE for HOME Studie durchgeführt wurden. CARE for HOME rekrutierte zwischen 2008 bis 2015 544 chronisch nierenkranke Patienten als Studienteilnehmer, die nachfolgend jährlich nachbeobachtet wurden.

Ich danke daher explizit Frau Esther Herath, Frau Anja Weihrauch und Frau Franziska Flügge, die im Wesentlichen die Erstuntersuchungen der CARE for HOME Studienteilnehmer durchführten; alle diese Arbeitsgruppenmitglieder, die die Einschlussuntersuchungen und frühere Nachuntersuchungen vor Beginn meiner Promotionsarbeit im Oktober 2014 durchgeführt haben, ermöglichten aufgrund ihres kollegialen Arbeitsstils das Gelingen der langjährigen CARE for HOME Studie. Auf der Basis dieser Vorarbeiten durfte ich dann im Oktober 2014 die epidemiologische Arbeit im CARE for HOME Projekt übernehmen und eigenverantwortlich bis Oktober 2015 fortführen.

Die laborchemischen Untersuchungen der Blutproben erfolgten durch das Zentrallabor des UKS sowie durch das hausinterne nephrologische Laborteam unter Leitung der medizinisch-technischen Assistentin Frau Martina Wagner. Im Zentrallabor des UKS unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Geisel erfolgte die Messung etablierter Routinelaborparameter, die für die klinische Betreuung der Patienten auch außerhalb der Studie erforderlich war. Laborparameter außerhalb der klinischen Routine, insbesondere die Bestimmung des Hormons Plasma-FGF-23 (auch im Kontext dieser Promotionsarbeit) und von Monozytensubpopulationen (im Kontext vorheriger Promotionsarbeiten), wurden durch das nephrologische Labor bestimmt. Hierbei war von Prof. Dr. Danilo Fliser und Prof. Dr. Gunnar Heine Frau Martina Wagner bewusst mit der routinemäßigen Messung von Plasma-FGF-23 betraut, um eine möglichst hohe Standardisierung der Labordiagnostik über mehrere Jahre zu gewährleisten.

Ohne die genannte technische Unterstützung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich bei allen, die daran mitgewirkt haben, herzlich bedanken.

In Absprache mit dem Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. Danilo Fliser sowie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gunnar Heine wurden die über viele Jahre bis Oktober 2014 gemeinschaftlich erhobenen Gesamtdaten für meine Promotionsarbeit herangezogen. Die Studiendaten zwischen Oktober 2014 und Oktober 2015 wurden eigenständig von mir erhoben.

Soweit in der Dissertation das Personalpronomen „wir“ Verwendung findet, geschieht dies zur Kenntlichmachung der gemeinschaftlichen mehrjährigen Datenerhebung im Rahmen der CARE for HOME Studie. Die Datenanalyse und die statistische Auswertung der Daten im Hinblick auf den wissenschaftlichen Gegenstand dieser Arbeit („Die Hypoferritinämie, der lange gesuchte Mediator des Zusammenhangs zwischen erhöhtem Plasma-FGF-23 und

erhöhter renaler und kardiovaskulärer Mortalität bei chronischer Nierenerkrankung?“) erfolgte demgegenüber ausschließlich durch mich als Verfasserin der vorliegenden Dissertationsschrift und ohne Inanspruchnahme fremder Hilfe.

Zuletzt gilt mein persönlicher Dank meiner Familie, meiner Schwester Vanessa, meiner Mutter Conny und meinem Vater Edmund - ohne euch wäre diese Promotionsarbeit und mein ganzes Studium nicht möglich gewesen. Auch meinen Großeltern, wenngleich sie den Abschluss dieser Dissertation nicht mehr miterleben können, möchte ich danken - euch stolz zu machen, war mir sehr wichtig. Vielen Dank für alles.

## **9. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

