

Aus dem  
Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar  
Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Klinikdirektor: Prof. Dr. D. Fliser

# Fibroblast Growth Factor 23 übertrifft lösliches Klotho als renaler Prädiktor bei chronischer Nierenerkrankung

---

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

2012

vorgelegt von  
Michael Fehrenz  
geboren am 21.04.1988 in Homburg/Saar

Tag der Promotion:

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

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abstract.....	4
Kurzfassung .....	5
1. Einleitung .....	6
1.1 Fibroblast Growth Factor 23 .....	7
1.1.1 Struktur FGF-23.....	7
1.1.2 Funktion / Pathophysiologie FGF-23 .....	7
1.1.3 FGF-23 und chronische Nierenerkrankung.....	8
1.2 Klotho .....	9
1.2.1 Klotho - Gen und Protein.....	9
1.2.2 Funktion / Pathophysiologie Klotho .....	10
1.2.3 Klotho und chronische Nierenerkrankung.....	11
1.2.4 Klotho als Prädiktor.....	12
1.3 Arbeitshypothesen .....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Studienkohorte .....	13
2.1.1 Auswahl der Probanden.....	13
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	13
2.2 Untersuchungsablauf.....	16
2.2.1 Blut- und Urindiagnostik.....	16
2.3 Bestimmung von sKlotho.....	17
2.4 Bestimmung von FGF-23 .....	18
2.5 Erfassung anthropometrischer Daten.....	18
2.5.1 Körpergröße, Körpergewicht und Body-Mass-Index .....	18
2.5.2 Taillenumfang, Hüftumfang, Hüft-Taillen-Quotient.....	18

2.6 Erfassung des kardiovaskulären Risikos .....	19
2.6.1 Blutdruckmessung .....	19
2.6.2 Fragebogen .....	19
2.7 Definition Studienendpunkt.....	20
2.8 Procedere der jährlichen Nachkontrolle .....	20
2.9 Dokumentation der Ergebnisse und statistische Auswertung .....	21
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1 Baseline Charakteristika .....	22
3.2 Plasmaspiegel von sKlotho .....	25
3.3 Zusammenhang zwischen sKlotho und Markern des Ca-P <sub>i</sub> -Metabolismus.....	28
3.4 Ambulante Nachbeobachtung.....	30
3.5 Prädiktive Eigenschaften von Markern des Ca-P <sub>i</sub> -Metabolismus .....	33
3.6 Cox Regressionsanalyse .....	37
3.7 Diuretika .....	38
3.7.1 Zusammenhang zw. Diuretikatherapie und Markern des Ca-P <sub>i</sub> -Metabolismus .....	38
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1 Bedeutung von Klotho in der chronischen Nierenerkrankung.....	44
4.1.1 Klotho und Nierenfunktion.....	44
4.1.2 Klotho als Prädiktor des renalen- und des Gesamtüberlebens .....	48
4.1.3 Klotho in Gewebe und Urin .....	51
4.2 Bedeutung von FGF-23 in der chronischen Nierenerkrankung .....	51
4.2.1 Epidemiologische Bedeutung von FGF-23 .....	52
4.2.2 Pathophysiologische Folgen erhöhter FGF-23 Plasmaspiegel.....	58
4.2.3 FGF-23 und Diuretikatherapie.....	60
4.3 Zusammenfassung.....	61
4.4 Ausblick .....	61

5. Anhang .....	63
5.1 Einverständniserklärung .....	63
5.2 Datenschutzerklärung.....	64
5.3 Fragebogen kardiovaskuläres Risiko .....	65
5.4 Fragebogen Follow-up (telefonisch) .....	71
6. Literaturverzeichnis .....	74
7. Tabellenverzeichnis.....	87
8. Abbildungsverzeichnis.....	89
9. Abkürzungsverzeichnis.....	90
10. Publikationen .....	92
11. Kongressvorstellungen .....	93
12. Danksagung.....	94

# Abstract

Chronic kidney disease - mineral and bone disorders (CKD-MBD) substantially contribute to the high burden of cardiovascular morbidity in patients with impaired renal function. During progression of chronic kidney disease (CKD), individual components of CKD-MBD occur at specific time points. Nonetheless, the exact temporal sequence of these alterations remains unclear. Only very recently, the phosphaturic hormone fibroblast growth factor (FGF)-23 and its cellular coreceptor Klotho have been identified as central components of CKD-MBD, and it has been hypothesized that a decreased expression of Klotho may represent the very initial pathophysiological alteration in early CKD-MBD. Of note, Klotho exists in both membrane-bound and secreted (sKlotho) forms.

Against this background, we analyzed plasma sKlotho and FGF-23 levels as well as other components of CKD-MBD in a cohort of 321 patients with stage 2-4 CKD. Patients were prospectively followed for an average of 2 years for the occurrence of death, halving eGFR or initiation of renal replacement therapy.

At baseline, plasma sKlotho levels were significantly associated with age, but not with glomerular filtration rate or other parameters of CKD-MBD. In longitudinal analysis, FGF-23 independently predicted renal outcome, while sKlotho did not.

Thus, plasma levels of sKlotho were not related to kidney function and did not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. Future studies are needed to understand in how far tissue expression, urinary excretion, and plasma levels of Klotho may diverge in progressive chronic kidney disease.

# Kurzfassung

Stoffwechselstörungen im Calcium-, Phosphat- und Knochenhaushalt chronisch nierenkranker Menschen („Chronic kidney disease - mineral and bone disorders“; CKD-MBD) tragen zentral zur erhöhten kardiovaskulären Morbidität bei chronischer Nierenerkrankung bei. Mit Voranschreiten einer chronischen Nierenerkrankung treten einzelne Komponenten der CKD-MBD zeitlich gestaffelt auf, obschon die genaue zeitliche Abfolge dieser Veränderungen unklar ist. Der phosphaturische Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)-23 und sein zellulärer Co-Rezeptor Klotho wurden erst vor wenigen Jahren als zentrale Komponenten der CKD-MBD identifiziert. Es wurde daraufhin postuliert, dass eine verminderte Expression von Klotho die initiale pathophysiologische Veränderung der CKD-MBD darstellen könnte. Klotho existiert in einer membranständigen und in einer sezernierten Form (sKlotho).

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in einer Kohorte von 321 chronisch nierenkranken Probanden in den K/DOQI Stadien 2-4 sKlotho, FGF-23 und weitere Komponenten der CKD-MBD. Alle Patienten wurden prospektiv nachverfolgt; die mittlere Nachbeobachtungszeit beträgt zwei Jahre. Als renaler Endpunkt wurde das Auftreten einer Halbierung der glomerulären Filtrationsrate, die Einleitung einer Nierenersatztherapie und Tod jedweder Genese definiert.

In Querschnittsanalysen korreliert sKlotho signifikant mit dem Alter der Probanden, nicht jedoch mit der glomerulären Filtrationsrate oder anderen CKD-MBD Parametern. In der prospektiven Nachverfolgung erweist sich nicht sKlotho, sondern FGF-23 auch nach multivariater Anpassung als Prädiktor des renalen Endpunktes.

Somit kann sKlotho weder in der Querschnittsanalyse mit der Nierenfunktion, noch in der Longitudinalanalyse mit der renalen Prognose assoziiert werden. Zukünftige Studien sollten untersuchen, ob im Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung Gewebeexpression, Urinexkretion und die Plasmaspiegel von Klotho divergieren.

# 1. Einleitung

Weltweit ist eine stetige Zunahme von Inzidenz und Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung („Chronic Kidney Disease“, CKD) zu verzeichnen. So lässt sich in einer Querschnittsanalyse großer US-amerikanischer Datenbanken eine Zunahme der Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung in den Stadien K/DOQI („Kidney Disease Outcomes Quality Initiative“) 1-4 von 10 % auf 13 % in der nordamerikanischen Bevölkerung feststellen <sup>3</sup>. Ähnliches gilt für die deutsche Bevölkerung <sup>4</sup>, obgleich hierzulande leider keine detaillierteren epidemiologischen Daten vorliegen.

Im Vergleich zur nierengesunden Normalbevölkerung geht die CKD mit einer deutlich erhöhten kardiovaskulären Mortalität einher <sup>5</sup>. Einerseits lässt sich dieses deutlich erhöhte Mortalitätsrisiko partiell auf „klassische“ kardiovaskuläre Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Nikotinkonsum zurückführen. Andererseits spielen darüber hinaus differente Faktoren als in der nierengesunden Normalbevölkerung eine zentrale Rolle. Hierzu zählen unter anderem eine chronische Mikroinflammation, oxidativer Stress, renale Anämie und insbesondere ein gestörter Calcium-Phosphat-Metabolismus (Ca-P<sub>i</sub>-Metabolismus). Prospektive klinische Studien zeigen, dass eine Hyperphosphatämie, ein sekundärer Hyperparathyroidismus sowie ein Mangel an Vitamin D <sup>6-9</sup> jeweils unabhängig mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei CKD-Patienten vergesellschaftet sind.

Die therapeutische Beeinflussung einerseits von „klassischen“ kardiovaskulären Risikofaktoren wie die Behandlung einer Hypercholesterinämie <sup>10,11</sup> und der Einsatz von ACE-Hemmern <sup>12</sup>, andererseits von dialysespezifischen Faktoren (High-Flux vs. Low-Flux-Membranen) <sup>13</sup> oder das Anheben des Hämoglobin-Wertes auf erhöhte Zielwerte mittels Erythropoetintherapie <sup>14,15</sup>, erzielten jedoch leider bisher keine definitive Prognosebesserung bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung.

Im Gegensatz zu diesen enttäuschenden Ergebnissen erscheint die therapeutische Beeinflussung des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse vielversprechend <sup>16-18</sup>, obgleich Ergebnisse von prospektiven, kontrollierten Interventionsstudien zumeist noch ausstehen.

Während das traditionelle Konzept des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels bei nierenkranken Menschen sich vor allem auf die Trias sekundäre



Hyperphosphatämie, Hyperparathyroidismus und Hypovitaminose D fokussiert, weisen Ergebnisse wissenschaftlicher Studien der letzten 15 Jahre auf weitere regulatorische Komponenten des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels hin. Von besonderer klinischer Bedeutung erscheint hierbei das kürzlich entdeckte phosphaturische Hormon FGF-23 (Fibroblast Growth Factor).

### 1.1 *Fibroblast Growth Factor 23*

#### 1.1.1 Struktur FGF-23

Die FGF-Familie definiert sich aus sieben bisher bekannten Untergruppen von Polypeptiden <sup>19,20</sup>. FGF-23, eines von drei Mitgliedern der FGF-19 Familie, ist ein zentraler Regulator der Calcium-Phosphat-Homöostase <sup>21,22</sup> und wird primär von Osteoblasten sowie zu einem geringeren Anteil von Osteozyten gebildet <sup>20,23</sup>. Gegensätzlich zu anderen FGFs zeichnet sich FGF-23 durch eine endokrine statt parakrine Wirkung aus, welche durch seine einzigartige beta-Kleeblatt-Struktur bedingt ist. Durch Disulfid-Brücken stabilisiert, bedingt diese Struktur eine niedrige Affinität zu Heparin <sup>19</sup> und ermöglicht FGF-23, welches mit einer Halbwertszeit von 58 min im Blutkreislauf zirkuliert <sup>24</sup>, endokrin zu wirken.

#### 1.1.2 Funktion / Pathophysiologie FGF-23

Physiologisch reguliert FGF-23 das Ausmaß der Phosphatausscheidung der Nieren über den von proximalen Tubuluszellen exprimierten Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter vom Typ II. Dieser an der apikalen Zellmembran exprimierte Transporter ist für die Reabsorption von Phosphat aus dem Primärharn verantwortlich <sup>25</sup>. FGF-23 greift durch Reduktion der Anzahl des zellmembranständigen Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter Typ II effektiv in die Phosphat-Homöostase ein <sup>26</sup>.

Molekularbiologisch lässt sich die Gruppe der Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter vom Typ II in weitere Untergruppen differenzieren, von denen vor allem der Subtyp Na/P<sub>i</sub> IIa <sup>27</sup> sowie zu etwa einem Drittel der Subtyp IIc <sup>28</sup> für die Phosphatrückresorption

verantwortlich sind. Für FGF-23 vermittelte phosphaturische Effekte ist primär Subtyp IIa verantwortlich <sup>26</sup>.

Verschiedene Mausmodelle bestätigen die durch Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter vermittelten phosphaturischen Effekte von FGF-23. Die Überexpression von FGF-23 äußert sich durch einen exzessiven renalen Phosphatverlust durch Suppression der Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter <sup>29-31</sup>. Kongruent zeigt sich bei FGF-23 knock-out Mäusen eine Überexpression der Na/P<sub>i</sub> Co-Transporter sowie eine daraus resultierende Hyperphosphatämie <sup>32-34</sup>.

Neben seinen regulatorischen Effekten auf die renale Phosphatausscheidung beeinflusst FGF-23 direkt - durch Suppression des gastrointestinalen Na/P<sub>i</sub> Transporter vom Typ IIb <sup>35</sup> - als auch indirekt - durch Reduktion der Serumspiegel von aktivem Vitamin D, welches die intestinale Calcium- und Phosphataufnahme aus der Nahrung steigert - die intestinale Resorption von Phosphat <sup>35</sup>. Das Phosphatonin FGF-23 supprimiert hierbei die Spiegel von aktivem Vitamin D <sup>31,36</sup> durch Hemmung der Expression der alpha-Hydroxylase (CYP27B1), dem Schlüsselenzym der Synthese von aktivem Vitamin D (Calcitriol). Zusätzlich vermittelt es eine vermehrte Expression der 24-Hydroxylase (CYP24A1), welche für die Degradation von Calcitriol verantwortlich ist <sup>31</sup>. Umgekehrt erhöht Calcitriol auf Transkriptionsebene die FGF-23 Bildung, so dass sich ein negativer Feedbackkreislauf schließt <sup>37</sup>. Ein weiterer Regulationskreis resultiert aus der Hemmung der Expression von Parathormon in den C-Zellen der Nebenschilddrüse durch FGF-23 <sup>38</sup> und der Induktion der FGF-23 Bildung durch Parathormon <sup>39</sup>.

### 1.1.3 FGF-23 und chronische Nierenerkrankung

Vergleicht man FGF-23 Spiegel zwischen gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit CKD im Stadium der Dialysepflichtigkeit (K/DOQI 5D), lassen sich in der Gruppe der Dialysepatienten mehr als 100-fach erhöhte FGF-23 Serumwerte nachweisen <sup>40</sup>.

Bereits vor Erreichen der Dialysepflichtigkeit steigen FGF-23 Spiegel bei chronisch nierenkranken Menschen mit abnehmender glomerulärer Filtrationsrate (GFR) kontinuierlich an. Als gesichert gilt, dass die fortgeschrittene CKD mit erhöhten FGF-23 Werten einhergeht <sup>41</sup>. Neue Studienergebnisse suggerieren darüber hinaus, dass FGF-23 Spiegel bereits in sehr frühen Stadien der CKD ansteigen <sup>42</sup>. So steigen

die FGF-23 Spiegel bei Patienten in Stadien K/DOQI 2-3 und somit bei bereits nur geringer Einschränkung der GFR an <sup>40,41,43,44</sup>. Von besonderem Interesse erscheint, dass FGF-23 Spiegel hierbei bereits erhöht sind, bevor Parathormon oder Serum-Phosphat ansteigen <sup>45,46</sup>.

Eine Hyper-FGF-23-ämie erscheint von großer klinischer Bedeutung, da einerseits FGF-23 zur Aufrechterhaltung vermeintlich normaler Phosphatwerte bei Patienten mit abnehmender glomerulärer Filtrationsrate beiträgt, andererseits jedoch erhöhte FGF-23 Spiegel in mehreren epidemiologischen Arbeiten Prädiktoren von kardiovaskulären Ereignissen, renalen Ereignissen und Gesamtmortalität sind <sup>47-49</sup>.

Daher ist ein Verständnis des komplexen Regelkreises der Calcium-Phosphat-Homöostase von großer Bedeutung, um die Therapie der chronischen Nierenerkrankung zu verbessern. Als initiale Ursache des Anstieges von FGF-23 in frühen Stadien der CKD, noch bevor ein Hyperparathyroidismus oder eine Hyperphosphatämie apparent sind, wird eine verminderte Expression des FGF-23 Co-Rezeptors Klothos diskutiert. Da FGF-23 zur Entfaltung seiner Funktion in den physiologischen Zielorganen Niere und Nebenschilddrüsen auf zellulärer Ebene obligat auf Klotho angewiesen ist, könnte ein Klotho-Mangel hypothetisch in einer sekundären Hyper-FGF-23-ämie münden <sup>38</sup>.

## 1.2 Klotho

### 1.2.1 Klotho - Gen und Protein

Das Klotho-Gen setzt sich aus 5 Exons zusammen <sup>50,51</sup>, welche für ein 1014 Aminosäuren (AS) langes transmembranöses Protein vom Typ I kodieren. Die äußerst kurze intrazelluläre Domäne mit einer Länge von 10 AS besitzt keine bekannten funktionellen Gruppen. Die extrazelluläre Domäne weist zwei interne Repeats auf und zeigt eine schwach ausgeprägte Homologie zu Glycosidasen der Familie I, welche die Fähigkeit besitzen, beta-glykosidische Verbindungen in Sacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden zu hydrolysieren <sup>52,53</sup>.

Klotho wird hauptsächlich in den Regulationsorganen des Calcium-Phosphat-Metabolismus wie dem distalen Tubuluskonvolut der Niere <sup>52</sup> und den Nebenschilddrüsen <sup>54</sup> exprimiert. Weitere Expressionsorte des Peptidhormons sind

die Plexus Choroidei des Encephalons <sup>52</sup>, Hypophyse, Nebenschilddrüsen <sup>54</sup>, Pankreas, Ovarien, Testes und Plazenta <sup>52</sup>.

### 1.2.2 Funktion / Pathophysiologie Klotho

Es existieren mindestens zwei verschiedene Formen von Klotho: Membranständiges Klotho (mKlotho) ist als obligater Co-Faktor für FGF-23 entscheidend für die physiologische Wirkung von FGF-23 <sup>55-57</sup>. Aufgrund seiner äußerst niedrigen Rezeptoraffinität vermag FGF-23 unter physiologischen Konzentrationen in Abwesenheit von Klotho es nicht, FGF-Rezeptoren (FGFRs) zu aktivieren <sup>58</sup>. Klotho steigert die Affinität zwischen FGF-23 und FGFR durch Bildung eines binären Komplexes mit verschiedenen FGFR Isoformen (FGFR1c, 3c und 4) <sup>56,57</sup>.

Durch eine Abtrennung der extrazellulären Domäne von mKlotho durch extrazelluläre Proteasen entsteht sezerniertes Klotho (sKlotho), welches als humoraler Faktor wirkt <sup>59</sup> und in Blut, Urin sowie Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden kann <sup>60,61</sup>. sKlotho wirkt auf verschiedene Ionenkanäle sowie Wachstumsfaktorrezeptoren („Growth Factor Receptors“, GFRs) an der Zelloberfläche modulierend und verhindert physiologisch die Internalisierung von TRPV5 sowie TRPV6 („Transient Receptor Potential“, Kationenkanal, Subfamilie V, Mitglied 5 bzw. 6) von der Zelloberfläche <sup>62,63</sup>.

TRPV5 ist ein Calciumkanal, der an der apikalen Seite renaler Tubuluszellen exprimiert wird und die Rückresorption von Calcium aus dem Primärharn steuert <sup>64</sup>. Tierexperimentelle Daten belegen eine Regulation der Calcium-Homöostase des Organismus durch sKlotho <sup>65</sup>.

Durch Modulation des Calciumkanals TRPV6, der in intestinalen Epithelien exprimiert wird, beeinflusst die sezernierte Form von Klotho zusätzlich direkt die intestinale Calciumaufnahme <sup>38</sup>.

Des Weiteren verhindert sezerniertes Klotho die Internalisierung von ROMK1 („Renal Outer Medullary Potassium Channel“). ROMK1 ist ein an der apikalen Membran von renalen Tubuluszellen exprimierter Kaliumkanal, der primär für die Sekretion von Kalium in den Urin verantwortlich ist. Durch Verhinderung dessen Internalisierung erreicht sKlotho eine gesteigerte Kaliumausscheidung via Urin <sup>66</sup>.

Eine weitere Funktion von sKlotho besteht in der direkten Regulation des NaP<sub>i</sub>-IIa Phosphattransporters, welcher ebenfalls durch FGF-23 supprimiert wird. Durch

enzymatische Modifikation sinken Anzahl und Aktivität dieses Phosphattransporters, was zu einer - durch Klotho direkt vermittelten, von FGF-23 unabhängigen - Phosphaturie führt <sup>67</sup>.

### 1.2.3 Klotho und chronische Nierenerkrankung

Studien belegen die Abnahme der Expression von Klotho bei Patienten mit fortschreitender chronischer Nierenerkrankung: Zum einen führt das Voranschreiten der CKD zu verminderter Expression von Klotho in den Nebenschilddrüsen <sup>68-71</sup>, zum anderen ist die Expression des Klotho Proteins auch im Nierengewebe von CKD Patienten signifikant geringer ausgeprägt <sup>72</sup>. Diese Veränderungen führen konsekutiv zu einem - durch FGF-23-Resistenz der Nebenschilddrüsen bedingten - sekundären Hyperparathyreoidismus. Gleichzeitig kann eine renale FGF-23 Resistenz postuliert werden, so dass zur adäquaten renalen Phosphatausscheidung eine vermehrte Sekretion von Parathormon einerseits, FGF-23 andererseits, erforderlich wird <sup>38</sup>.

Bestimmungen von sKlotho in Blut und Urin von Mäusen zeigen, dass im tierexperimentellen CKD Modell sKlotho bei renaler Funktionsminderung kontinuierlich abnimmt <sup>73</sup>. In Analogie wird eine Abnahme von sKlotho im Urin des Menschen bereits in sehr frühen Stadien der CKD (K/DOQI 1-2) berichtet <sup>73</sup>, während sKlotho im Plasma von CKD Patienten aus methodischen Gründen bis vor Kurzem nicht bestimmt werden konnte.

Darüber hinaus erweist sich Klotho im Tiermodell als renoprotektiver Faktor. Verschiedene gentechnische Verfahren wie Überexpression oder Injektion rekombinanten Klothos führen zu einer Verbesserung funktioneller und morphologischer renaler Parameter <sup>74-76</sup>.

### 1.2.4 Klotho als Prädiktor

Bisher stand kein Assay zur Bestimmung humanen sKlothos zur Verfügung, was die Bestimmung des Ausmaßes der Klothoexpression *in vivo* schwierig gestaltete. Zwar waren invasive Nachweismethoden per Exzision und anschließender Färbung des entnommenen Gewebes möglich, jedoch weder im klinischen Alltag, noch in epidemiologischen Studien sinnvoll einsetzbar. Erst seit 2009 steht ein ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay") zur Verfügung<sup>73,77</sup>.

Völlig unklar ist bisher, ob Patienten mit chronischer Nierenerkrankung einen Abfall von sKlotho aufweisen. Weiterhin ist unbekannt, inwieweit bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sKlotho mit anderen Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels assoziiert ist.

### 1.3 Arbeitshypothesen

Folgende Hypothesen sollen daher im Rahmen dieser Dissertation geprüft werden:

1. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung korreliert sKlotho mit anderen Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels wie den Plasmaspiegeln von FGF-23, Calcium, Phosphat und Vitamin D sowie der fraktionellen Calcium- und Phosphatexkretion im Urin.
2. Patienten mit chronischer Nierenerkrankung weisen mit progredienter Einschränkung der Nierenfunktion abnehmendes sKlotho auf.
3. Der Anstieg von sKlotho bei progredienter Einschränkung der Nierenfunktion tritt vor einem Anstieg der FGF-23 Spiegel auf.
4. sKlotho erweist sich bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung als unabhängiger Prädiktor des renalen Überlebens und des Gesamtüberlebens.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studienkohorte

#### 2.1.1 Auswahl der Probanden

Im Zeitraum von September 2008 bis Februar 2011 wurden im Rahmen der laufenden CARE FOR HOME Studie 321 ambulant behandelte Patienten der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten - am Universitätsklinikum des Saarlandes (Homburg/Saar) rekrutiert. Die Studienteilnehmer wurden telefonisch oder bei vorangegangenen ambulanten Vorstellungen zur Studienteilnahme eingeladen. Alle Patienten gaben vor Untersuchungsbeginn ihr schriftliches Einverständnis (siehe Anhang). Das Untersuchungsprotokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

#### 2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Definition und Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung folgen den Leitlinien der K/DOQI der "National Kidney Foundation" (NKF) <sup>78</sup>. Als Definition der CKD gelten demnach folgende Kriterien:

- a) eine mindestens drei Monate anhaltende Nierenschädigung, definiert durch strukturelle oder funktionelle Veränderungen der Niere mit oder ohne eingeschränkter GFR, welche durch:
- pathologische Veränderungen *oder*
  - Marker der Nierenschädigung (von Normwerten abweichende Blut-/Urinwerte bzw. durch bildgebende Verfahren belegte Veränderungen)
- belegt werden kann, *und/oder*

b) das Vorliegen einer geschätzten („estimated“) glomerulären Filtrationsrate (eGFR) von  $< 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  für mindestens drei Monate mit oder ohne Nierenschädigung <sup>79</sup>.

Die eGFR ist gleichzeitig auch Parameter für die Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung und wird in der CARE FOR HOME Studie entsprechend den K/DOQI Leitlinien nach der MDRD („Modification of Diet in Renal Disease Studie“) 4 Formel errechnet <sup>80</sup>.

Tabelle 1: Stadieneinteilung chronische Nierenerkrankung

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )
1	Strukturelle oder funktionelle Nierenfunktionsstörung bei normaler GFR	> 90
2	Gering reduzierte GFR	60-89
3	Deutlich reduzierte GFR	30-59
4	Stark reduzierte GFR	15-29
5 (D)	Terminale Niereninsuffizienz	< 15 (oder Dialyse)



### Einschlusskriterien:

In die CARE FOR HOME Studie werden Patienten in den Stadien 2 - 4 nach K/DOQI eingeschlossen, was einer eGFR von 15 - 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> entspricht. Bei Patienten im Stadium K/DOQI 2 musste mindestens eines der folgenden Kriterien vorliegen:

- persistierende Albuminurie > 17 / 25 (Männer / Frauen) mg/g Kreatinin
- persistierende glomeruläre Hämaturie
- erhöhtes Plasma-Cystatin C (> 1,05 mg/l)
- erhöhtes Plasma-Kreatinin [ $> 1,2$  mg/dl (Männer) /  $> 1,0$  g/dl (Frauen)]
- bioptisch gesicherte Nierenerkrankung
- hereditäre Nierenerkrankung

### Ausschlusskriterien:

Zum Ausschluss aus der Studie führt:

- das Vorliegen der K/DOQI Stadien I oder V
- eine bestehende HIV-Infektion
- die Einnahme von Immunsuppressiva
- ein zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch apparenter fieberhafter oder antibiotikapflichtiger Infekt
- ein aktives Malignom
- ein zu Studienbeginn erhöhtes C-reaktives Protein (CRP)  $> 50$  mg/l
- ein akutes Nierenversagen bei Verdopplung des Serum-Kreatinins binnen vier Wochen
- eine hämatologische Systemerkrankung

Die Prüfung auf das Vorliegen von Ausschlusskriterien erfolgt auf Basis des Patientengesprächs, der Patientenakte sowie der Prüfung von in Voruntersuchungen erhobenen Daten.

## 2.2 Untersuchungsablauf

### 2.2.1 Blut- und Urindiagnostik

Die Studienteilnehmer halten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine mindestens achtstündige Nahrungskarenz. Die Blutentnahme erfolgt am sitzenden Patienten nach fünfminütiger Ruhezeit. Mittels steriler Gefäßkanüle wird eine oberflächliche Armvene zur Entnahme von 54 ml venösem Vollblut punktiert. Die Analyse der erforderlichen Parameter erfolgt im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) ([www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/kliniken\\_institute/zentrallabor](http://www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/kliniken_institute/zentrallabor)).

Tabelle 2: Parameter Blutwerte

Blutprobe	Bestimmte Parameter
EDTA-Blut (2,7 ml EDTA-Monovette)	Differentialblutbild: Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Lymphozyten, Monozyten
Plasma (4,7 ml Lithium-Heparin-Monovette)	Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Glucose, ASAT, Lipoproteindiagnostik (Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride), Eiweiß, Albumin, Eisen, CRP, Ferritin, Troponin T
Serum (4,7 ml Serum-Monovette)	Apo A, Apo B, Insulin, Parathormon (intakt), NT-pro-BNP, 25-Hydroxy-Vitamin D3

*EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; ASAT, Aspartat-Aminotransferase; HDL, High Density Lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; CRP, C-reaktives Protein; Apo A, Apolipoprotein A1; Apo B, Apolipoprotein B; NT-pro-BNP, N-terminal prohormone of Brain Natriuretic Peptide.*

Des Weiteren wird Mittelstrahlurin asserviert, welcher ebenfalls bezüglich folgender Parameter im Zentrallabor des UKS analysiert wird:

Tabelle 3: Spontan- und Sammelurin-Untersuchungsparameter

Probe	Bestimmte Parameter
Urin (Portion) (10 ml Urin-Monovette)	Status, Sediment, Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Phosphor, Kreatinin, Albumin, Mikroglobulin, Eiweiß, Transferrin, Immunglobulin G, Kreatinin

### 2.3 Bestimmung von sKlotho

Die Quantifizierung von sKlotho im Serum der Patienten erfolgt mittels eines kommerziell verfügbaren ELISA (Immuno-Biological Laboratories Co., LTD, Fujioka-shi, Gunma, Japan <sup>77</sup>). Dieser Sandwich-Assay besteht aus zwei spezifischen und hochaffinen Antikörpern, welche an verschiedene Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Die im Verhältnis 2:1 vorverdünnte Patientenprobe wird bei Raumtemperatur (RT) für 60 Minuten auf einer vorbeschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Diese Zeit benötigen die im Serum befindlichen Antigene, um an den gebundenen Antikörper anti-humanen Klotho (67G3) Maus IgG zu binden. Nach Waschung der Platte folgt eine 30 minütige Inkubation bei RT mit HRP (horseradish Peroxidase)-konjugierten anti-humanen Klotho (91F1) Maus IgG Fab-Antikörpern. Nach erneutem Waschen der Platte wird für die letzte Reaktion das chromogene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) und darauffolgend eine Stopp-Lösung zugegeben. Der dabei entstehende Farbumschlag, dessen Intensität die Klothokonzentration reflektiert, wird im Spektrophotometer bei 450 nm gemessen.

### 2.4 Bestimmung von FGF-23

Die Bestimmung von FGF-23 im Serum der Probanden erfolgt analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise ebenfalls mittels kommerziell verfügbarem ELISA (Immutopics, San Clemente, CA, USA; untere Nachweisgrenze 1,5 rU/ml, obere Nachweisgrenze 1500 rU/ml). Proben mit einer FGF-23 Konzentration > 1500 rU/ml werden nach Verdünnung gemessen. Der von uns verwendete Sandwich-Assay ist spezifisch für die C-terminale Form des Fibroblast Growth Factor-23, welche sich gegenüber dem intakten FGF-23 als messtechnisch stabiler erweist. Deshalb wird C-terminales FGF-23 für klinische Studien als geeignetere Form betrachtet <sup>81</sup>.

### 2.5 Erfassung anthropometrischer Daten

#### 2.5.1 Körpergröße, Körpergewicht und Body-Mass-Index

Das Körpergewicht des bekleideten Patienten wird mit einer geeichten digitalen Waage auf 100 g genau bestimmt. Die Messung der Körpergröße erfolgt am aufrecht stehenden, barfüßigen Probanden an einer Messlatte. Aus beiden Werten lässt sich der Body-Mass-Index (BMI) berechnen:

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

Formel: Body-Mass-Index

#### 2.5.2 Taillenumfang, Hüftumfang, Hüft-Taillen-Quotient

Mit einem flexiblen Maßband wird auf Höhe des Trochanter major der Hüftumfang, sowie in der Mitte zwischen Rippenbogen und Crista iliaca der Taillenumfang bei Expiration gemessen. Aus beiden Werten lässt sich zur Abschätzung der Körperfettverteilung der Hüft-Taillen-Quotient (Waist-hip ratio) berechnen:

$$\text{Hüft-Taillen-Quotient} = \text{Hüftumfang (cm)} / \text{Taillenumfang (cm)}$$

Formel: Waist-hip ratio

## 2.6 Erfassung des kardiovaskulären Risikos

### 2.6.1 Blutdruckmessung

Die nicht-invasive Blutdruckmessung erfolgt nach einem standardisierten Protokoll mit einem automatischen Messgerät (DINAMAP® PROCARE Auscultatory 100, SOMA Technology, USA). Nach fünfminütiger Ruhepause wird der Blutdruck sowohl am rechten als auch am linken Oberarm in sitzender Position gemessen.

### 2.6.2 Fragebogen

Zusätzlich werden anhand eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) kardiovaskuläre Risikofaktoren und kardiovaskuläre Comorbidität im Interviewstil durch den Untersucher erfragt.

Zunächst erfolgt die Erfassung einer prävalenten koronaren, cerebrovaskulären oder peripher-arteriellen Gefäßerkrankung<sup>82</sup>.

Die Quantifizierung der sportlichen Aktivität der Probanden erfolgt als Anzahl der Wochentage, an welchen sich der Proband mindestens 30 Minuten in einem Ausmaß sportlich betätigt, dass er ins Schwitzen gerät.

Zur Erfassung der körperlichen Inaktivität wird die Anzahl der mit Fernsehen verbrachten Stunden an Werktagen und an Wochenendtagen erfasst.

Des Weiteren wird der Nikotinkonsum dokumentiert, wobei diejenigen Teilnehmer als Raucher definiert werden, die in den letzten vier Wochen vor Studieneinschluss mindestens eine Zigarette konsumiert haben. Ebenso erfasst wird der Zeitraum, in welchem der Proband aktiver Raucher war, der Zeitpunkt des letzten Zigarettenkonsums, sowie die Anzahl der Zigaretten, die der Proband täglich durchschnittlich geraucht hat.

In der Alkoholanamnese wird der wöchentliche Konsum verschiedener Getränkesorten in Gläsern pro Woche eruiert. Unterschieden wird zwischen Rotwein, Weißwein, Bier und Spirituosen, wobei 120 ml Wein, 350 ml Bier und 45 ml Spirituosen als jeweils ein Glas gelten.

Abschließend wird das Vorhandensein einer Tumorerkrankung, einer chronisch-entzündlichen Darm- oder Lebererkrankung, einer akuten Infektionserkrankung in den letzten 5 Tagen vor Studieneinschluss sowie die aktuelle Medikation erfragt.

### *2.7 Definition Studienendpunkt*

Als kombinierter Studienendpunkt wurde eine Halbierung der eGFR, das Auftreten einer Dialysepflichtigkeit bei terminaler Niereninsuffizienz oder der Tod des Patienten definiert.

### *2.8 Procedere der jährlichen Nachkontrolle*

Für jeden Probanden wird jährlich ein Termin zur ambulanten Wiedervorstellung vereinbart. Kann in Einzelfällen dieser Termin nicht wahrgenommen werden, wird der Patient und / oder sein Hausarzt telefonisch kontaktiert und die erforderlichen Informationen mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) erhoben.

Die jährliche ambulante Nachkontrolle umfasst in enger Analogie zu der Ausgangsuntersuchung bei Studienbeginn:

- standardisierte Entnahme 54 ml venösen Vollblutes
- standardisierte Erfassung des aktuellen Körpergewichtes
- Erhebung eines standardisierten Fragebogens (s. Anhang) im Interviewstil durch den Untersucher
- nicht-invasive Blutdruckmessung und standardisierte Intervallblutdruckmessung
- standardisierte Bestimmung der Hautfaldendicke der Probanden
- Aufzeichnung eines Elektrokardiogramms
- standardisierte Echokardiographie
- Aufzeichnung eines 24 h-Blutdruckprofils
- Asservation von 24 h-Sammelurin

Der Verfasser der vorgelegten Dissertationsschrift hat alle Folgeuntersuchungen der Studienteilnehmer zwischen dem 01.01.2011 und dem 28.02.2012 selbständig durchgeführt und nach Bestimmung der sKlotho Serumspiegel im Jahr 2011 aus asservierten, tiefgefrorenen Serumproben alle in der Dissertationsschrift aufgeführten Studienergebnisse zur Bedeutung von sKlotho bei chronischer Nierenerkrankung errechnet. Die Patientenrekrutierung zu Studienbeginn erfolgte im Rahmen eigenständiger Promotionsarbeiten.

## 2.9 Dokumentation der Ergebnisse und statistische Auswertung

Alle Messdaten werden mittels Microsoft® Excel oder Access verwaltet (Microsoft, Seattle, Washington, USA).

Für die statistische Auswertung der Daten wird die Statistik Software SPSS (Statistical Product and Service Solutions; Version 17.0 Chicago, Illinois, USA) und SimpleStat Test (©2007-2011 by Marley W. Watkins) verwendet<sup>83</sup>.

Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, bei Abweichung von der Normalverteilung als Median [25. und 75. Perzentile] angegeben und mittels T-Test (zwei Gruppen) oder mittels ANOVA mit gewichtetem linearen Term (mehr als zwei Gruppen) verglichen.

Kategoriale Variablen werden als absolute Werte und als prozentualer Anteil an dem Gesamtkollektiv angegeben und mittels Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) verglichen.

Zusammenhänge zwischen zwei kontinuierlichen Variablen werden als Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % wird  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant definiert.

## 3. Ergebnisse

### *3.1 Baseline Charakteristika*

Die Charakteristika der 321 Probanden sind in Tabelle 4 dargestellt. Das mittlere Serum-Kreatinin der Patienten beträgt  $1,65 \pm 0,68$  mg/dl, die mittlere eGFR  $43,9 \pm 15,6$  ml/min. Nach Stratifikation der Patienten in K/DOQI Stadien weisen die meisten Patienten eine chronische Nierenerkrankung Stadium K/DOQI 3 auf, welche daher in die Stadien K/DOQI 3a (45,0 - 59,9 ml/min) und 3b (30,0 - 44,9 ml/min) unterteilt werden. Patienten in fortgeschrittenen K/DOQI-Stadien sind durch höheres Alter, höhere kardiovaskuläre Komorbidität, höhere Albuminurie sowie höhere Plasma-Phosphat- (Abbildung 1) und Entzündungswerte (CRP) charakterisiert. Die Medikamentenanamnese stellt heraus, dass diese Patienten signifikant häufiger mit Vitamin D Präparaten therapiert werden.



Tabelle 4: Baseline Charakteristika der Patienten - unterteilt nach K/DOQI Stadien 2-4

	Gesamt- kohorte (n=321)	K/DOQI 2 (n=51)	K/DOQI 3a (n=106)	K/DOQI 3b (n=93)	K/DOQI 4 (n=71)	p
Alter (Jahre)	65,5±12,1	59,8±11,4	63,6±12,5	68,6±11,0	68,3±11,6	<0,001
Geschlecht weiblich (%)	125 (38,9)	15 (29,4)	43 (40,6)	39 (41,9)	28 (39,4)	0,489
Raucher (%)	35 (10,9)	10 (19,6)	13 (12,3)	7 (7,5)	5 (7,0)	0,116
Diabetes mellitus (%)	123 (38,3)	19 (37,3)	40 (37,7)	37 (39,8)	27 (38,0)	0,988
CVD (%)	105 (32,7)	6 (11,8)	32 (30,2)	40 (43,0)	27 (38,0)	<0,001
CRP (mg/l)	2,7 (1,2-5,1)	2,4 (1,7-4,3)	2,5 (1,1-5,3)	2,7 (1,2-5,0)	3,3 (1,1-5,4)	0,046
Gesamt- Cholesterin (mg/dl)	193±42,8	205±35,5	190±40,8	190±43,1	194±49,1	0,308
HDL-C (mg/dl)	49,8±16,4	49,9±13,8	51,0±16,8	49,2±16,3	48,6±17,8	0,437
LDL-C (mg/dl)	117±35,2	128±30,5	114±33,9	114±34,6	118±39,8	0,212
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,4±5,5	30,8±6,2	30,7±5,5	30,9±5,7	29,2±4,4	0,118
Calcium (mmol/l)	2,4±0,1	2,3±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,2	0,574
Phosphat (mg/dl)	3,4±0,7	3,0±0,5	3,3±0,5	3,4±0,8	3,9±0,7	<0,001
eGFR (ml/min/ 1,73 m <sup>2</sup> )	43,8±15,6	67,6±5,8	51,8±4,1	38,2±4,4	22,2±4,2	<0,001
Albuminurie (mg/g)	37,4 (7,8-201)	27,8 (7,7-188)	18,3 (5,6-106)	42,7 (7,0-140)	127 (39,2-633)	<0,001

FePi (%)	26,4±13,1	17,6±7,7	20,3±9,0	28,1±10,5	40,0±13,4	<0,001
FeCa (%)	0,7±0,8	0,5±0,4	0,6±0,5	0,8±1,0	0,8±1,0	0,824
BB (%)	217 (69,6)	25 (49,0)	72 (67,9)	73 (78,5)	47 (66,2)	0,004
ACE-I (%)	129 (40,2)	20 (39,2)	46 (43,4)	37 (39,8)	26 (36,6)	0,836
ARB (%)	158 (50,6)	27 (52,9)	55 (51,9)	46 (49,5)	30 (42,3)	0,580
Statin (%)	156 (48,6)	16 (31,4)	53 (50,0)	50 (53,8)	37 (52,1)	0,058
Natives Vitamin D (%)	140 (43,6)	21 (41,2)	37 (34,9)	39 (41,9)	43 (60,0)	0,007
Aktives Vitamin D (%)	30 (9,3)	1 (2,0)	1 (0,9)	13 (14,0)	15 (21,1)	<0,001

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte- ± Standardabweichung. CRP Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (inter-quartile range) angegeben. CVD: cardiovascular disease (Herz-Gefäß-Erkrankungen); CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: High density lipoprotein-Cholesterin; LDL-C: Low density lipoprotein-Cholesterin; BMI: Body mass index; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; FeCa: fractional excretion of calcium (fraktionelle Calciumausscheidung, Urin); FePi: fractional excretion of phosphate (fraktionelle Phosphatausscheidung, Urin); BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren; ARB: Angiotensin-Rezeptor-Blocker.

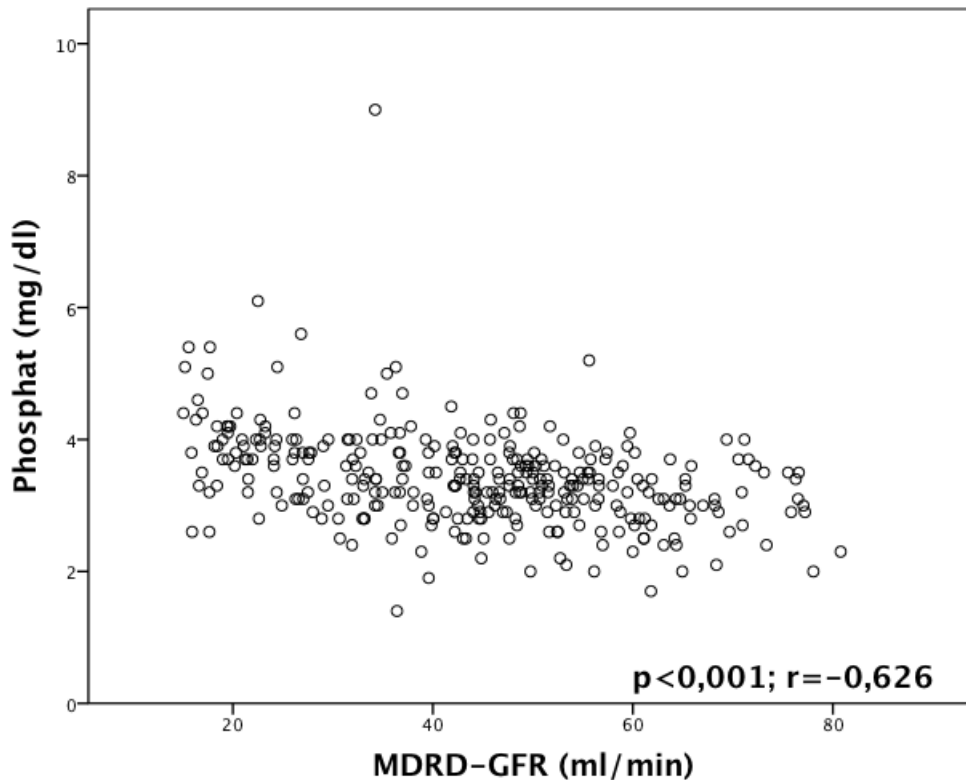
Abbildung 1: Spearman-Korrelation Serum-P<sub>i</sub> und eGFR

Abbildung 1: Spearman-Korrelation Serum-Phosphat (mg/dl) und glomeruläre Filtrationsrate (MDRD; ml/min);  $p < 0,001$ ; Korrelationskoeffizient  $r = -0,626$ .

### 3.2 Plasmaspiegel von sKlotho

Das mittlere sKlotho bei Einschluss beträgt  $580,8 \pm 214,0$  pg/ml.

Die Unterteilung in sKlotho Tertile zeigt, dass Probanden mit dem höchsten sKlotho jüngeren Alters sind, eine höhere Albuminurie und niedrigere CRP-Spiegel im Serum aufweisen. Patienten der untersten sKlotho Tertile hingegen werden häufiger mit einem Statin therapiert. Darüber hinaus stellen sich keinerlei weitere signifikanten Unterschiede in den Ausgangscharakteristika und Komorbiditäten zwischen diesen drei Gruppen heraus (Tabelle 5).

sKlotho unterscheidet sich nicht zwischen den K/DOQI Stadien ( $p = 0,098$ , Abbildung 2), während mit abnehmender Nierenfunktion signifikant höhere Werte von fraktioneller Phosphatausscheidung im Urin (FePi [ $p < 0,001$ ]), Plasma FGF-23 ( $p < 0,001$ ) und Parathormon ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden.

Tabelle 5: Baseline Charakteristika der Patienten - unterteilt nach sKlotho Plasmaspiegeln

	sKlotho Tertile 1 (278,6-480,3 pg/ml) n=108	sKlotho Tertile 2 (480,4-620,0 pg/ml) n=106	sKlotho Tertile 3 (623,9-2130 pg/ml) n=107	p
sKlotho (pg/ml)	400 (355-452)	538 (506-572)	742 (665-837)	<0,001
Alter (Jahre)	66,6±11,4	66,6±11,0	63,3±13,6	0,044
Geschlecht weiblich (%)	41 (38,0)	45 (42,5)	39 (36,4)	0,646
Raucher (%)	16 (14,8)	7 (6,6)	12 (11,2)	0,155
Diabetes mellitus (%)	40 (37,0)	35 (33,3)	48 (44,9)	0,195
CVD (%)	39 (36,1)	32 (30,2)	34 (31,8)	0,632
CRP (mg/l)	2,6 (1,3-5,6)	2,9 (1,7-5,9)	2,1 (1,0-4,4)	0,026
Gesamt- Cholesterin (mg/dl)	190±39,2	191±39,2	198±49,3	0,152
HDL-C (mg/dl)	49,9±14,9	48,3±14,3	51,2±19,5	0,568
LDL-C (mg/dl)	113±34,4	118±32,5	120±38,5	0,159
BMI (kg/m²)	29,9±5,2	31,0±5,7	30,4±5,5	0,445
Albuminurie (mg/g)	28,8 (6,8-185)	26,2 (4,9-106)	86,7 (18,8-615)	0,019
BB (%)	75 (69,4)	75 (70,8)	67 (62,6)	0,394
ACE-I (%)	37 (34,3)	45 (42,5)	47 (43,9)	0,297
ARB (%)	53 (49,1)	50 (47,2)	55 (51,4)	0,826
Statin (%)	67 (62,0)	50 (47,2)	39 (36,4)	<0,001

Natives Vitamin D (%)	44 (40,7)	46 (43,4)	50 (46,7)	0,378
Aktives Vitamin D (%)	10 (9,3)	10 (9,4)	10 (9,3)	0,983

*Angegeben sind Anzahl (Prozent)- oder Mittelwert-  $\pm$  Standardabweichung. CRP-, sKlotho und Albuminurie sind bei fehlender Normalverteilung als Median (inter-quartile range) angegeben. CVD: cardiovascular disease (Herz-Gefäß-Erkrankungen); CRP: C-reaktives Protein; HDL-C: High density lipoprotein-Cholesterin; LDL-C: Low density lipoprotein-Cholesterin; BMI: Body mass index; BB: Beta-Blocker; ACE-I: Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitoren; ARB: Angiotensin-Rezeptor-Blocker.*

### 3.3 Zusammenhang zwischen sKlotho und Markern des Ca-P<sub>i</sub>-Metabolismus

Die Analyse der Zusammenhänge zwischen verschiedenen Markern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels zeigt, dass FGF-23 Spiegel mit Parathormon, fraktioneller Phosphatausscheidung im Urin sowie mit den Phosphat Plasmaspiegeln korrelieren. sKlotho hingegen zeigt keinerlei Assoziation zu Parametern des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels (Tabelle 6).

Tabelle 6: Koeffizienten der Spearman Korrelation von Parametern des Calcium-Phosphat-Metabolismus und sKlotho

	sKlotho (pg/ml)					
Calcium (mmol/l)	r = 0,01 p = 0,916	Calcium (mmol/l)				
Phosphat (mg/dl)	r = -0,06 p = 0,291	r = -0,02 p = 0,705	Phosphat (mg/dl)			
PTH (pg/ml)	r = 0,05 p = 0,374	r = -0,05 p = 0,348	r = 0,08 p = 0,134	PTH (pg/ml)		
FeCa (%)	r = -0,03 p = 0,564	r = 0,07 p = 0,248	r = 0,06 p = 0,276	r = -0,07 p = 0,203	FeCa (%)	
FePi (%)	r = 0,05 p = 0,392	r = -0,02 p = 0,778	r = 0,05 p = 0,384	r = 0,52 p < 0,001	r = 0,10 p = 0,093	FePi (%)
FGF-23 (rU/ml)	r = -0,03 p = 0,652	r = 0,00 p = 0,961	r = 0,40 p < 0,001	r = 0,34 p < 0,001	r = 0,08 p = 0,170	r = 0,38 p < 0,001

Angegeben sind Korrelationskoeffizient (r) sowie das Signifikanzniveau (p). PTH: Parathormon; FeCa: fraktionelle Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionelle Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

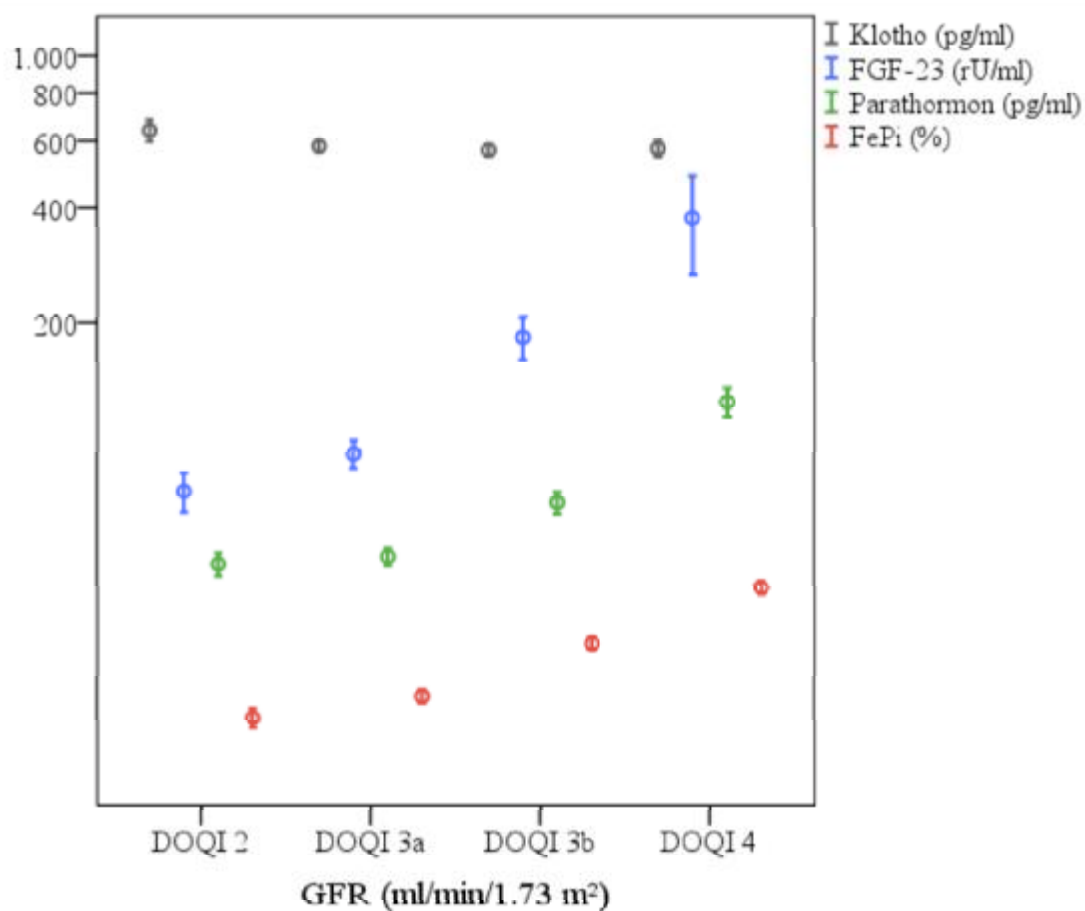
Abbildung 2: Parameter des Ca-P<sub>i</sub>-Metabolismus, stratifiziert nach K/DOQI

Abbildung 2: sKlotho ( $p=0,098$ ), FGF-23 ( $p < 0,001$ ), Parathormon ( $p < 0,001$ ) und fraktionelle Phosphatausscheidung ( $p < 0,001$ ) nach K/DOQI Stadien unterteilt; statistischer Test: Einfaktorielle ANOVA mit Test für linearen Trend.

### 3.4 Ambulante Nachbeobachtung

Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit beträgt  $2,0 \pm 0,8$  Jahre, kein Patient ging während des Follow-up verloren. Der definierte kombinierte Endpunkt ist bei 39 Patienten (12,0 %) aufgetreten; bei 26 Patienten halbierte sich die eGFR oder sie erreichten die terminale Niereninsuffizienz (ESRD) und sind auf eine Nierenersatztherapie (RRT; „Renal Replacement Therapy“) angewiesen, 13 Patienten verstarben vor Erreichen der ESRD.

Nach ambulanter Nachbeobachtung stellen sich in der von uns durchgeführten nicht-interventionellen prospektiven Kohortenstudie die Marker FGF-23, FePi und Parathormon, als Prädiktoren des ereignisfreien Überlebens dar. Serumphosphat-Spiegel sind auf signifikantem Niveau prädiktiv für das Erreichen eines renalen bzw. eines kombiniert-renalen Endpunktes (definiert als Halbierung der GFR und/oder RRT u./o. Tod). Für sKlotho kann auf Basis der von uns erhobenen Daten keine dieser Aussagen auf signifikantem Niveau getroffen werden (Tabelle 7).

Die Analyse des Einflusses klassischer Risikofaktoren der CKD bezüglich des Auftretens eines Ereignisses stellt die Nierenfunktion (berechnet als eGFR) als Prädiktor des ereignisfreien Überlebens heraus. Weiter zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines renalen bzw. kombiniert-renalen Endpunktes bei Albuminurie (Tabelle 8).



Tabelle 7: Mittelwerte bzw. Median von Markern des Ca-P<sub>i</sub>-Stoffwechsels, stratifiziert nach Ereignissen

	Ereignis	Tod	RRT / 50% Abfall eGFR	Tod / RRT / 50% Abfall eGFR
n	nein	303	295	282
	ja	18	26	39
FGF-23 (rU/ml)	nein	96,4 (57,7-155)	92,9 (56,6-146)	91,1 (56,4-145)
	ja	126 (101-395)	229 (147-229)	178 (119-352)
	p	0,010	<0,001	<0,001
sKlotho (pg/ml)	nein	536 (452-663)	530 (449-663)	530 (451-663)
	ja	579 (447-756)	635 (499-718)	607 (449-710)
	p	0,474	0,071	0,238
Phosphat (mg/dl)	nein	3,4±0,7	3,4±0,7	3,4±0,7
	ja	3,5±0,5	4,1±0,9	3,8±0,8
	p	0,357	<0,001	<0,001
FePi	nein	26,0±13,1	25,3±12,5	24,9±12,5
	ja	33,6±11,1	39,9±12,4	37,6±12,5
	p	0,006	<0,001	<0,001
Calcium (mmol/l)	nein	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1
	ja	2,4±0,1	2,3±0,2	2,4±0,2
	p	0,521	0,259	0,828
FeCa	nein	0,7±0,8	0,7±0,8	0,7±0,8
	ja	1,0±1,1	0,9±1,0	0,9±1,0
	p	0,457	0,497	0,301
PTH (pg/ml)	nein	69,6±59,0	65,6±51,6	64,9±52,1
	ja	97,1±56,7	134±94,8	116±83,6
	p	0,002	<0,001	<0,001

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionale Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

Tabelle 8: Vorliegen klassischer Risikofaktoren der CKD, stratifiziert nach Ereignissen

	Ereignis	Tod	RRT / 50% Abfall eGFR	Tod / RRT / 50% Abfall eGFR
n	nein	303	295	282
	ja	18	26	39
Alter (Jahre)	nein	65,0±12,2	65,6±12,1	65,2±12,1
	ja	73,3±6,6	64,3±13,0	67,3±12,2
p		0,002	0,659	0,307
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	nein	30,5±5,5	30,5±5,5	30,6±5,6
	ja	29,2±4,9	29,6±4,7	29,3±4,9
p		0,351	0,410	0,158
RR Systolisch (mmHg)	nein	153±24,0	153±24,1	153±23,8
	ja	153±30,0	157±26,2	156±27,6
p		0,977	0,323	0,420
RR Diastolisch (mmHg)	nein	87,3±12,7	87,0±12,7	87,2±12,7
	ja	78,8±11,0	85,1±14,2	84,1±13,0
p		0,003	0,672	0,180
Diabetes mellitus (%)	nein	115 (35,8)	109 (34,0)	105 (32,7)
	ja	8 (2,5)	14 (4,5)	18 (5,6)
p		0,622	0,070	0,296
GFR (ml/min)	nein	44,3±15,6	45,5±14,9	45,8±14,9
	ja	35,6±13,7	24,7±9,6	29,5±13,1
p		0,011	<0,001	<0,001
CRP (mg/l)	nein	2,6 (1,1-4,8)	2,7 (1,2-5,0)	2,6 (1,2-4,8)
	ja	6,8 (2,1-10,0)	2,7 (1,1-6,4)	3,8 (1,1-9,6)
p		0,018	0,974	0,154
Albuminurie (mg/g)	nein	33,7 (7,7-193)	30,5 (7,2-145)	29,6 (7,2-142)
	ja	82,2 (21,8-320)	333 (66,9-1958)	238 (49,8-954)
p		0,166	<0,001	<0,001

Angegeben sind Anzahl (Prozentwert) bzw. Mittelwerte- ± Standardabweichung. CRP Spiegel und Albuminurie sind aufgrund fehlender Normalverteilung als Median (inter-quartile range) angegeben. CRP: C-reaktives Protein; BMI: Body mass index; eGFR: estimated (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate.

### 3.5 Prädiktive Eigenschaften von Markern des Ca-P<sub>i</sub>-Metabolismus

Eine Unterteilung der Subgruppen nach sKlotho Tertilen zeigt keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ereignisfreien Überlebens unter den drei gebildeten Gruppen (Abbildung 3). Im Kontrast dazu zeigt eine Einteilung nach FGF-23 Tertilen ein signifikant schlechteres Überleben der Patienten mit FGF-23 Spiegeln der obersten Tertile (Abbildung 4). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich für eine Gruppeneinteilung nach Serumspiegeln von Parathormon oder fraktioneller Phosphatausscheidung im Urin (Abbildung 5 und 6).

Abbildung 3: sKlotho und ereignisfreies Überleben

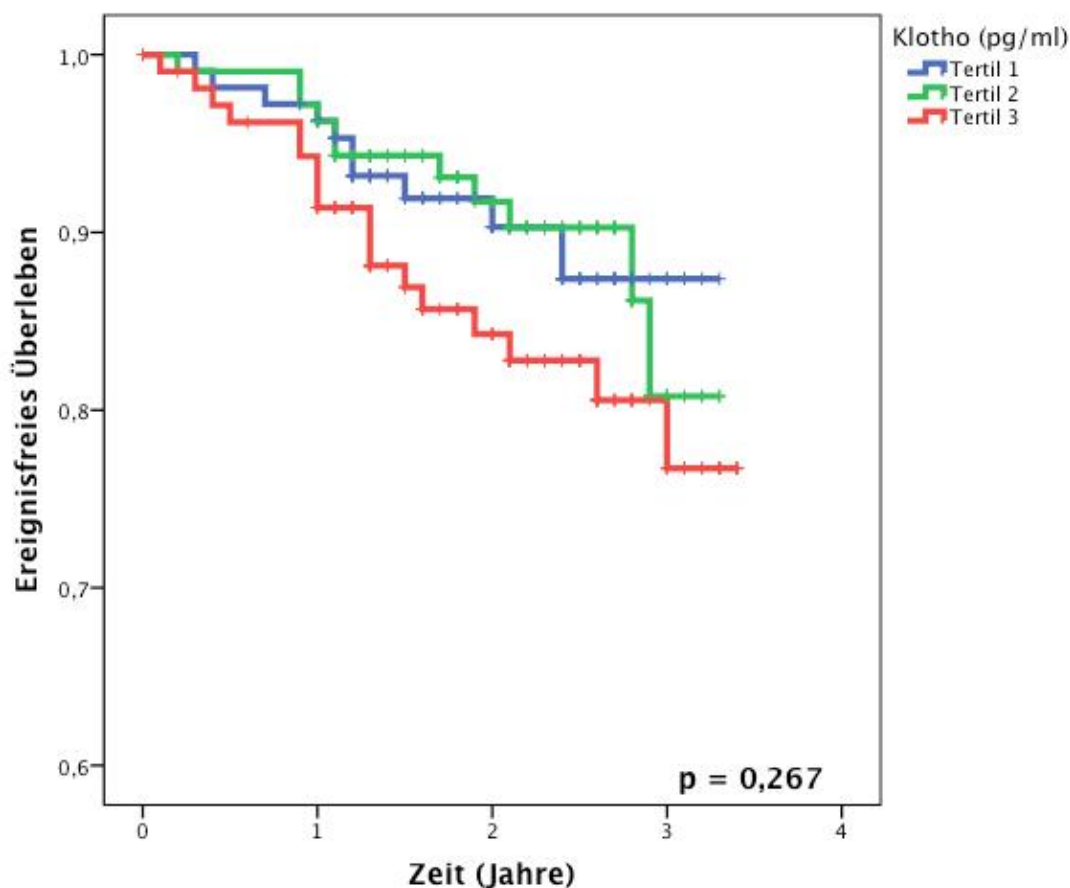


Abbildung 3: sKlotho und ereignisfreies Überleben. Einteilung nach sKlotho (Tertil 1: 278,6-480,3 pg/ml, Tertil 2: 480,4-620,0 pg/ml, Tertil 3: 623,9-2130,0 pg/ml). Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank Test ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,267$ ).

Abbildung 4: FGF-23 und ereignisfreies Überleben

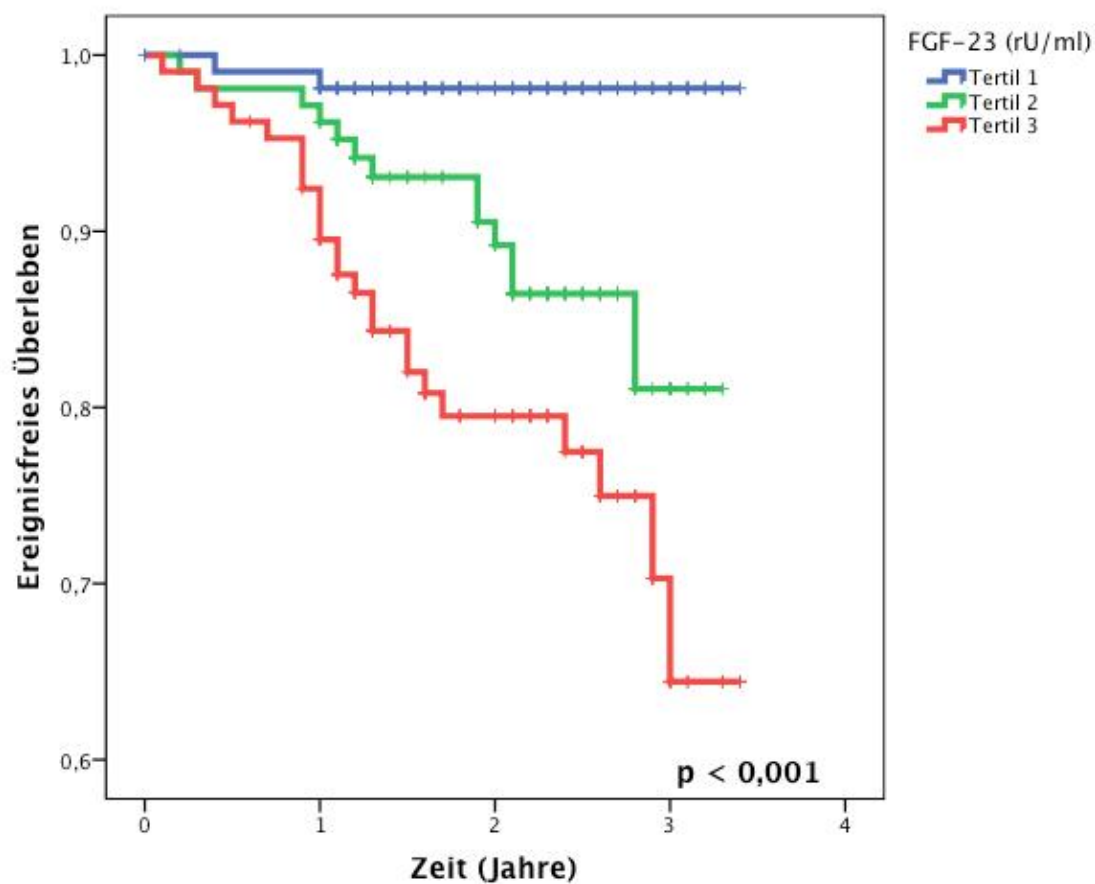


Abbildung 4: FGF-23 Spiegel und ereignisfreies Überleben. Einteilung nach FGF-23 Spiegel (Tertile 1: 14,8-71,2 rU/ml, Tertile 2: 71,6-136,8 rU/ml, Tertile 3: 138,1-7273,9 rU/ml). Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank Test ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p < 0,001$ ).

Abbildung 5: Parathormon Spiegel und ereignisfreies Überleben

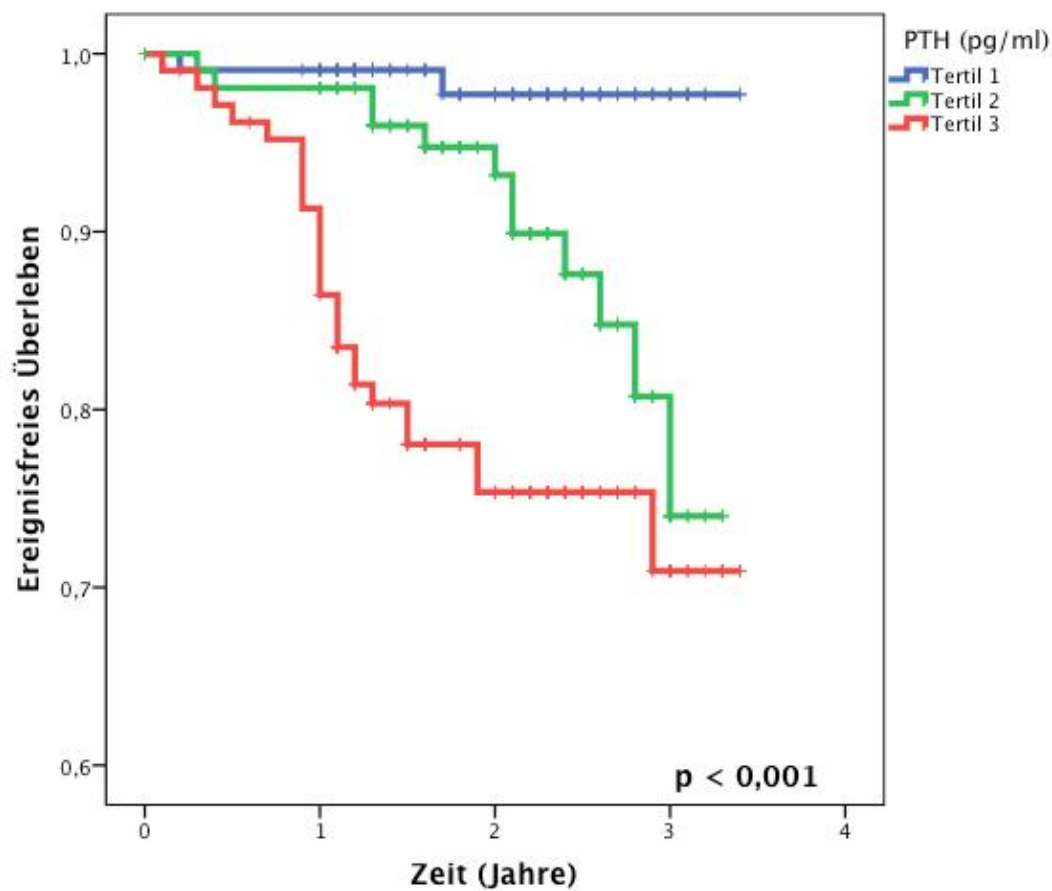


Abbildung 5: Parathormon Spiegel und ereignisfreies Überleben. Einteilung nach Parathormon Spiegel (Tertile 1: 4-42 pg/ml, Tertile 2: 43-68 pg/ml, Tertile 3: 69-475 pg/ml). Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank Test ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p < 0,001$ ).

Abbildung 6: Fraktionelle Phosphatausscheidung und ereignisfreies Überleben

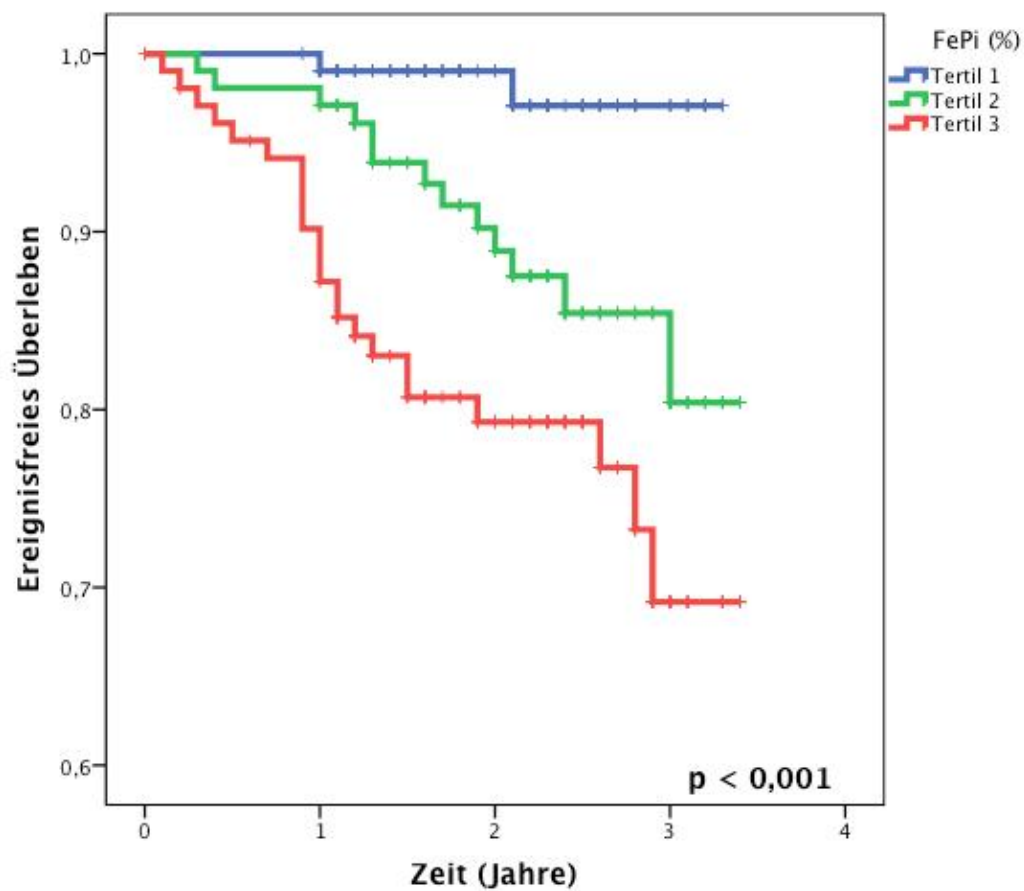


Abbildung 6: Fraktionelle Phosphatausscheidung und ereignisfreies Überleben. Einteilung nach FePi in % (Tertile 1: 2,74-19,65 %, Tertile 2: 19,66-29,68 %, Tertile 3: 29,75-74,87 %). Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank Test ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p < 0,001$ ).

### 3.6 Cox Regressionsanalyse

Erhöhten Spiegeln von FGF-23, PTH sowie FePi können in der Cox Regressionanalyse ein schlechteres Outcome in der univariaten Analyse zugeschrieben werden. Diese Aussage kann für sKlotho nicht auf statistisch signifikantem Niveau getroffen werden. Nach Anpassung des Regressionsmodells für Alter, eGFR und Albuminurie, bleibt FGF-23 der einzige unabhängige Prädiktor des kombinierten Studienendpunktes, während PTH und FePi ihre statistische Signifikanz als Prädiktoren verlieren (Tabelle 9).

Tabelle 9: Univariates und multivariates Cox Regressionsmodell (kombinierter Endpunkt ist Halbierung der eGFR, Initiation Nierenersatztherapie oder Tod)

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse (angepasst für eGFR, Alter, Ig Albuminurie)		
	B	SEM	p	B	SEM	p
Ig Klotho	0,584	1,193	0,624	0,633	1,307	0,628
PTH (pg/ml)	0,006	0,001	<0,001	0,001	0,002	0,124
FePi (%)	0,050	0,010	<0,001	0,009	0,013	0,495
Ig FGF-23	1,697	0,288	<0,001	0,867	0,409	0,034

*B: Regressionskoeffizient. SEM: "standard error of the mean", Standardfehler des Mittelwertes. p: Wert des Signifikanzniveaus. Klotho, FGF-23 und Albuminurie Spiegel wurden logarithmisch umgerechnet um eine annähernde Normalverteilung zu erreichen. eGFR: estimated Glomeruläre Filtrationsrate; PTH: Parathormon; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.*

### 3.7 Diuretika

#### 3.7.1 Zusammenhang zwischen Diuretikatherapie und Markern des Ca-P<sub>i</sub>-Metabolismus

Die Einnahme eines Schleifendiuretikums, nicht jedoch die Thiazideinnahme, ist mit signifikant erhöhten Serumspiegeln von FGF-23 und Parathormon sowie mit erhöhter fraktioneller Urin-Phosphatausscheidung (FePi) assoziiert (Tabelle 10). Die fraktionelle Urin-Calciumausscheidung ist bei Patienten mit Schleifendiuretikum erhöht, bei Patienten mit Thiazideinnahme vergleichsweise vermindert.

Da einerseits Patienten mit fortgeschrittener Nierenerkrankung höhere FGF-23 Spiegel aufweisen, andererseits wesentlich häufiger Schleifendiuretika rezeptiert bekommen, erfolgt zur Überprüfung der Assoziation zwischen Einnahme eines Schleifendiuretikums und FGF-23 eine Aufteilung der Probanden nach K/DOQI Stadien. Hier kann bei Patienten mit K/DOQI III - nicht jedoch K/DOQI 2 oder 4 - eine Assoziation zwischen Einnahme von Schleifendiuretika und höheren FGF-23 Spiegel bestätigt werden, obgleich aufgrund der relativ geringen Populationsgröße in den Subanalysen das Signifikanzniveau verfehlt wird (Tabellen 11 und 12).

Ebenso bleibt nach Korrektur für die linksventrikuläre Funktion (LVF) der Trend - erhöhte FGF-23 Spiegel durch Einnahme von Schleifendiuretika - erhalten (Tabellen 13 und 14).



Tabelle 10: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß Wirkstoffklasse der Diuretika

		Schleifendiuretikum	Thiaziddiuretikum
n	Nein	163	160
	Ja	156	159
Phosphat (mg/dl)	Nein	3,3±0,8	3,4±0,7
	Ja	3,5±0,7	3,4±0,8
	p	0,082	0,507
FePi	Nein	23,0±11,8	27,5±13,2
	Ja	30,1±13,5	25,4±13,1
	p	<0,001	0,158
Calcium (mmol/l)	Nein	2,4±0,1	2,4±0,1
	Ja	2,4±0,2	2,4±0,1
	p	0,900	0,177
FeCa	Nein	0,5±0,5	0,9±1,0
	Ja	0,9±1,0	0,5±0,5
	p	<0,001	<0,001
PTH (pg/ml)	Nein	52,5±33,1	75,3±59,9
	Ja	91,1±72,8	67,2±58,5
	p	<0,001	0,229
FGF-23 (rU/ml)	Nein	76,4 (50,5-116)	100,9 (57,3-156)
	Ja	125,4 (78,0-187)	96,2 (61,2-162)
	p	<0,001	0,831
sKlotho (pg/ml)	Nein	558 (458-678)	528 (449-663)
	Ja	524 (445-657)	556 (449-671)
	p	0,788	0,892

Zwei Patienten erhalten eine diuretische Bedarfsmedikation, deren Einnahme in den Vortagen der Untersuchung nicht sicher eruiert werden kann. Diese Patienten werden deshalb aus den oben genannten statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionale Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

Tabelle 11: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß CKD-Stadium und gemäß Einnahme von Schleifendiuretika

		K/DOQI 2	K/DOQI 3a	K/DOQI 3b	K/DOQI 4
n	kein SD	39	67	36	21
	SD	12	37	57	50
Phosphat (mg/dl)	kein SD	3,0±0,5	3,3±0,5	3,6±1,2	3,7±0,5
	SD	3,1±0,6	3,3±0,5	3,3±0,6	4,0±0,8
	p	0,495	0,481	0,179	0,148
FePi	kein SD	17,2±6,9	19,3±8,3	26,3±8,4	39,7±16,1
	SD	19,0±10,1	22,1±10,2	29,2±11,5	40,1±12,2
	p	0,566	0,133	0,194	0,906
Calcium (mmol/l)	kein SD	2,3±0,1	2,4±0,1	2,3±0,1	2,4±0,2
	SD	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,2
	p	0,295	0,433	0,071	0,330
FeCa	kein SD	0,5±0,4	0,5±0,4	0,5±0,6	0,6±0,7
	SD	0,6±0,5	0,7±0,7	1,0±1,2	0,9±1,1
	p	0,612	0,205	0,010	0,194
PTH (pg/ml)	kein SD	42,4±16,5	41,7±20,9	54,5±25,0	102±52,0
	SD	57,3±32,7	61,1±28,8	76,0±48,9	138±98,0
	p	0,155	<0,001	0,007	0,113
FGF-23 (rU/ml)	kein SD	57,2 (45,6-85,9)	69,2 (44,9-93,6)	105 (67-163)	181 (117-210)
	SD	48,7 (36,6-90,0)	85,8 (50,8-118)	128 (92-189)	174 (129-271)
	p	0,617	0,088	0,091	0,668
sKlotho (pg/ml)	kein SD	532 (429-680)	501 (421-589)	517 (389-639)	521 (381-553)
	SD	534 (464-679)	550 (391-633)	431 (395-523)	452 (359-508)
	p	0,472	0,299	0,540	0,066

Zwei Patienten erhalten eine diuretische Bedarfsmedikation, deren Einnahme in den Vortagen der Untersuchung nicht sicher eruiert werden kann. Diese Patienten werden deshalb aus den oben genannten statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionale Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

Tabelle 12: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß CKD-Stadium und gemäß Einnahme von Thiaziddiuretika

		K/DOQI 2	K/DOQI 3a	K/DOQI 3b	K/DOQI 4
n	kein TD	29	41	51	39
	TD	22	63	42	32
Phosphat (mg/dl)	kein TD	3,0±0,6	3,4±0,6	3,3±0,6	3,9±0,7
	TD	3,1±0,5	3,3±0,5	3,6±1,1	3,9±0,7
	p	0,624	0,428	0,113	0,893
FePi	kein TD	18,1±8,4	21,4±9,7	27,0±8,6	42,1±12,6
	TD	17,1±6,9	19,4±8,6	29,4±12,3	37,4±14,1
	p	0,666	0,283	0,297	0,148
Calcium (mmol/l)	kein TD	2,3±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,2
	TD	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,2
	p	0,480	0,881	0,709	0,300
FeCa	kein TD	0,6±0,4	0,7±0,7	1,0±1,2	1,1±1,2
	TD	0,4±0,3	0,6±0,4	0,6±0,7	0,4±0,5
	p	0,028	0,364	0,073	0,002
PTH (pg/ml)	kein TD	47,1	51,0±22,3	68,2±43,8	131±84,3
	TD	44,4	47,1±27,6	66,8±41,1	123±95,6
	p	0,663	0,446	0,875	0,720
FGF-23 (rU/ml)	kein TD	51,3 (41,9-78,1)	75,4 (50,6-103)	120 (72,4-169)	160 (119-213)
	TD	58,8 (47,2-91,9)	68,6 (43,9-99,0)	113 (95,0-170)	191 (151-304)
	p	0,366	0,270	0,461	0,114
sKlotho (pg/ml)	kein TD	516 (435-632)	501 (402-604)	442 (369-593)	477 (382-529)
	TD	567 (443-763)	502 (417-589)	455 (404-559)	457 (339-548)
	p	0,947	0,655	0,276	0,261

Zwei Patienten erhalten eine diuretische Bedarfsmedikation, deren Einnahme in den Vortagen der Untersuchung nicht sicher eruiert werden kann. Diese Patienten werden deshalb aus den oben genannten statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionale Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

Tabelle 13: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der CKD Patienten mit erhaltener systolischer LV Funktion gemäß Einnahme von Schleifendiuretika

		K/DOQI 2	K/DOQI 3a	K/DOQI 3b	K/DOQI 4
n	kein SD	34	54	33	18
	SD	11	34	37	34
Phosphat (mg/dl)	kein SD	3,0±0,5	3,3±0,5	3,6±1,2	3,7±0,4
	SD	3,1±0,6	3,2±0,6	3,4±0,6	4,0±0,8
	p	0,610	0,345	0,287	0,162
FePi	kein SD	17,9±6,7	19,3±7,9	25,8±8,6	40,5±17,0
	SD	18,3±10,3	22,4±10,4	27,3±10,4	40,7±13,4
	p	0,879	0,121	0,548	0,972
Calcium (mmol/l)	kein SD	2,3±0,0	2,4±0,1	2,3±0,1	2,4±0,2
	SD	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,2	2,4±0,2
	p	0,273	0,632	0,045	0,316
FeCa	kein SD	0,5±0,4	0,6±0,4	0,6±0,6	0,6±0,8
	SD	0,6±0,5	0,7±0,8	1,1±1,2	1,1±1,2
	p	0,440	0,294	0,037	0,147
PTH (pg/ml)	kein SD	44,1±16,7	37,3±16,2	54,6±25,9	104±51,1
	SD	59,5 ± 33,2	62,2±29,7	63,0±30,8	137±103,4
	p	0,167	<0,001	0,226	0,205
FGF-23 (rU/ml)	kein SD	57,0 (45,6-77,3)	68,6 (44,9-93,1)	104 (64,6-160)	176 (117-205)
	SD	49,9 (36,6-94,2)	88,2 (51,8-113)	128 (80,9-185)	174 (135-259)
	p	0,792	0,100	0,264	0,671
sKlotho (pg/ml)	kein SD	545 (437-665)	504 (421-603)	525 (407-660)	512 (365-551)
	SD	576 (462-702)	552 (383-650)	442 (400-509)	455 (359-527)
	p	0,514	0,469	0,477	0,379

Zwei Patienten erhalten eine diuretische Bedarfsmedikation, deren Einnahme in den Vortagen der Untersuchung nicht sicher eruiert werden kann. Diese Patienten werden deshalb aus den oben genannten statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionelle Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionelle Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

Tabelle 14: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der CKD Patienten mit erhaltener systolischer LV Funktion gemäß Einnahme von Thiaziddiuretika

		K/DOQI 2	K/DOQI 3a	K/DOQI 3b	K/DOQI 4
n	kein TD	26	34	37	29
	TD	19	54	33	23
Phosphat (mg/dl)	kein TD	3,0±0,6	3,4±0,6	3,4±0,6	3,9±0,8
	TD	3,0±0,5	3,2±0,5	3,7±1,2	3,8±0,6
	p	0,880	0,188	0,205	0,873
FePi	kein TD	18,2±8,9	22,1±10,0	26,0±7,9	43,3±13,5
	TD	17,8±5,9	19,4±8,2	27,2±11,2	37,2±15,7
	p	0,864	0,163	0,597	0,145
Calcium (mmol/l)	kein TD	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,2
	TD	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,2	2,4±0,1
	p	0,718	0,632	0,849	0,032
FeCa	kein TD	0,6±0,4	0,7±0,7	1,0±1,2	1,3±1,3
	TD	0,4±0,4	0,6±0,4	0,7±0,8	0,5±0,5
	p	0,054	0,283	0,143	0,002
PTH (pg/ml)	kein TD	49,5±26,5	50,9±21,2	58,6±27,1	132±88,0
	TD	45,5±15,8	44,4±27,6	59,5±30,9	118±92,2
	p	0,564	0,243	0,894	0,592
FGF-23 (rU/ml)	kein TD	52,9 (43,2-77,8)	75,1 (50,7-103)	117 (51,4-154)	160 (119-217)
	TD	57,2 (46,2-91,1)	68,6 (46,7-99,3)	110 (86,5-174)	185 (149-309)
	p	0,696	0,498	0,269	0,233
sKlotho (pg/ml)	kein TD	512 (438-629)	510 (406-650)	462 (400-638)	456 (372-525)
	TD	576 (443-761)	504 (417-591)	488 (403-572)	473 (348-557)
	p	0,945	0,518	0,131	0,224

Zwei Patienten erhalten eine diuretische Bedarfsmedikation, deren Einnahme in den Vortagen der Untersuchung nicht sicher eruiert werden kann. Diese Patienten werden deshalb aus den oben genannten statistischen Berechnungen ausgeschlossen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. aufgrund fehlender Normalverteilung FGF-23 und sKlotho als Median (inter-quartil Range) sowie das Signifikanzniveau p. PTH: Parathormon; FeCa: fraktionale Calciumausscheidung, Urin; FePi: fraktionale Phosphatausscheidung, Urin; FGF-23: Fibroblast Growth Factor 23.

## 4. Diskussion

In der vorgelegten Dissertationsarbeit werden erstmalig in einer großen Kohorte nierenkranker Probanden gleichzeitig alle zentralen Marker des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels - Plasma-Calcium, Plasma-Phosphat, Parathormon, FGF-23 und sKlotho - auf ihre prädiktiven Eigenschaften zur Vorhersage der Progression der chronischen Nierenerkrankung sowie auf ihre wechselwirkenden Interaktionen hin untersucht.

Dabei fokussiert diese Dissertationsarbeit auf die Bedeutung der Serumspiegel von sKlotho bei nierenkranken Menschen, da aufgrund methodischer Schwierigkeiten erst seit wenigen Jahren Assays für die Bestimmung von humanem sKlotho zur Verfügung stehen.

### 4.1 *Bedeutung von Klotho in der chronischen Nierenerkrankung*

#### 4.1.1 Klotho und Nierenfunktion

Unsere CARE FOR HOME Studie verwirft in einer Kohorte von 321 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zunächst die initiale Hypothese, dass sKlotho mit dem Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung assoziiert ist. Zwischen jüngerem Alter der Probanden und höherem sKlotho zeigt sich ein schwacher signifikanter Zusammenhang.

Nach Etablierung eines ELISA zur Bestimmung von zirkulierendem sKlotho untersuchten in den letzten Jahren mehrere Kohortenstudien Zusammenhänge zwischen sKlotho und Nierenfunktion. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 15 zusammenfassend charakterisiert.

Die erste humane Kohortenstudie mit Bestimmung von sKlotho wird von Yamazaki *et al.* berichtet. Es zeigt sich zunächst - in Analogie mit den Ergebnissen der CARE FOR HOME Studie - dass sKlotho negativ mit dem Alter der Probanden korreliert und Patienten der niedrigsten sKlotho Tertile das höchste Alter aufweisen.

Darüber hinaus postulieren Yamazaki *et al.* eine negative Korrelation von sKlotho mit dem Serum-Kreatinin und eine positive Korrelation mit dem Serum-Phosphat <sup>77</sup>. Einer kritischen Überprüfung halten die Ergebnisse von Yamazaki *et al.* jedoch nur

bedingt stand, da der statistische Zusammenhang zwischen sKlotho und Serum-Kreatinin einerseits durch den gleichzeitigen Einschluss von Kindern und Erwachsenen, andererseits durch einzelne sKlotho-Extremwerte bedingt erscheint und zudem keine eGFR bestimmt wird. Die in die Studie eingeschlossenen Kinder unterscheiden sich in FGF-23, sKlotho, Serum-Kreatininspiegel und weiteren Parametern signifikant von Erwachsenen. Eine Korrelationsanalyse unter gleichzeitigem Einschluss von Kindern und Erwachsenen erscheint daher methodisch bedingt sinnvoll. Dementsprechend kann der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen sKlotho und der Nierenfunktion im univariaten Modell nach Korrektur für Alter und andere Störvariablen im multivariaten Regressionsmodell nicht bestätigt werden. Schließlich erschwert der fehlende Einschluss von Patienten mit erhöhten Kreatininwerten einen sinnvollen Rückschluss auf etwaige Assoziationen zwischen sKlotho und Nierenfunktion.

Mehrere nachfolgende Arbeiten untersuchen Kollektive von chronisch nierenkranken Patienten und berichten widersprüchliche Ergebnisse. So postulieren Shimamura *et al.* eine Assoziation zwischen Schwere einer Nierenfunktionseinschränkung und sKlotho, welche sich bei Stratifizierung nach K/DOQI Stadien allerdings auf einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten im Stadium K/DOQI 1 gegenüber allen anderen K/DOQI Stadien limitiert <sup>84</sup>. Zudem erscheint dieser statistische Zusammenhang durch extrem hohes sKlotho bei drei Studienteilnehmern in CKD Stadium K/DOQI 1 bedingt, welche bei kritischer Betrachtung als inhaltlich fraglich plausible Ausreißerwerte gelten müssen. Shimamura *et al.* gehen in ihrer Arbeit nicht näher darauf ein, ob die Serumspiegel sKlothos im weiteren Verlauf der CKD, also beispielsweise im Übergang von Stadium 2 zu Stadium 3, kontinuierlich und auf statistisch signifikantem Niveau abnehmen. Unsere CARE FOR HOME Studie kann die Kernaussage der Arbeit von Shimamura *et al.* nicht überprüfen, dass Patienten im frühesten CKD Stadium signifikant höheres sKlotho aufweisen als andere CKD Patienten, da Patienten im CKD Stadium K/DOQI 1 nicht in die CARE FOR HOME Studie aufgenommen werden.

Im Kontrast zu der Annahme, dass mit fortschreitender chronischer Nierenerkrankung sKlotho abnimmt <sup>85</sup>, haben zwei kürzlich veröffentlichte Studien erhöhtes sKlotho bei CKD-Patienten beobachtet <sup>86,87</sup>. Nähere Begutachtung dieser beiden Arbeiten lassen jedoch methodische Zweifel aufkommen, da beide Arbeiten ihre Aussage auf ein sehr kleines Patientenkollektiv von lediglich 30 <sup>86</sup> respektive

61<sup>87</sup> CKD Patienten stützen. Darüber hinaus erscheinen beide Kollektive klinisch unpräzise charakterisiert: So werden etwa in beiden Arbeiten keine Subgruppen der chronischen Nierenerkrankung gemäß K/DOQI gebildet, was die Interpretation einschränkt. Auch die jeweils gebildeten Kontrollgruppen von lediglich 10<sup>86</sup> bzw. 30<sup>87</sup> freiwilligen Probanden sind zum einen sehr klein gewählt, zum anderen bestehen signifikante Unterschiede bezüglich der Altersverteilung verglichen mit der jeweiligen CKD Kohorte. Zudem verzichteten Sugiura *et al.* in ihrer Arbeit auf eine Analyse zum Einfluss von sKlotho auf die Nierenfunktion (eGFR)<sup>86</sup>.

Einschränkend muss berücksichtigt werden, dass das primäre Ziel der Arbeit von Devaraj *et al.* die Validierung des sKlotho ELISA Assays war. Der Einfluss von chronischen Erkrankungen - Diabetes Mellitus und chronische Nierenerkrankung - auf sKlotho wurde nur begleitend untersucht, sodass hier offenbar bewusst das CKD-Patientenkollektiv lediglich in zwei Gruppen nach einem Kreatinin Schwellenwert von > bzw. < 1,2 mg/dl aufgeteilt wurde und eine Subgruppenunterscheidung gemäß K/DOQI fehlt<sup>87</sup>.

Eine weitere Arbeit von Pavik *et al.*, die bei Patienten mit ADPKD (Autosomal-dominant vererbter Polycystischer Nierenerkrankung) Resistenzmechanismen gegenüber FGF-23 untersucht, vergleicht sKlotho in einer kleinen Subgruppe von 32 nicht-ADPKD CKD-Probanden mit 20 nahezu altersgleichen, nierengesunden Kontrollprobanden, beschreibt jedoch nahezu identisches sKlotho in beiden Gruppen. Interessanterweise unterscheidet sich jedoch sKlotho bei ADPKD Patienten sowohl von gesunden Kontrollen als auch von den nicht-ADPKD CKD Patienten<sup>88</sup>. Neben der auch in dieser Studie geringen Probandenanzahl schmälert die Fokussierung auf CKD Patienten der Stadien K/DOQI 1 - 2 die Aussagekraft dieser Studie. Weiterhin überrascht die breite Streuung von sKlotho von < 500 pg/ml bis > 5000 pg/ml bei nicht-ADPKD CKD Patienten (und sogar < 100 pg/ml bis > 5000 pg/ml bei ADPKD Patienten!), welche in der vorgelegten Promotionsarbeit nicht nachvollzogen werden konnte.

Akimoto *et al.* untersuchen den Zusammenhang zwischen sKlotho und der Nierenrestfunktion bei 36 Peritonealdialyse (PD) Patienten<sup>89</sup> und stellen die Ergebnisse 11 gesunden Kontrollen gegenüber. Während im Vergleich PD Patienten niedrigeres sKlotho aufweisen, kann kein Zusammenhang zwischen sKlotho und der Nierenrestfunktion beobachtet werden, wohingegen die Klothoausscheidung im 24 h Urin mit der Nierenrestfunktion korreliert. Auch in dieser Studie überrascht die breite Streuung von sKlotho zwischen 194 pg/ml und 990 pg/ml bei den CKD Patienten und



384 pg/ml bis 1483 pg/ml in der Kontrollgruppe. Zusammenfassend stellt man anhand dieser Datenlage von sKlotho bei CKD-Patienten fest, dass sowohl Diskrepanzen bezüglich der Wertung sKlothos im Krankheitsbild der CKD bestehen, als auch, dass eine hohe interindividuelle Variabilität bezüglich der gemessenen sKlotho-Konzentrationspektren zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen vorhanden ist.

Unsere CARE FOR HOME reiht sich in dieses Spektrum kontroverser Kohortenstudien ein. Während sie alle bisherigen CKD Kohortenstudien in der Anzahl der eingeschlossenen Patienten übertrifft, kann die Beschränkung auf Patienten in den CKD Stadien 2-4 und die fehlende Rekrutierung nierengesunder Probanden als potentielle Limitation betrachtet werden. Allerdings erfolgt die Restriktion auf CKD Patienten in den CKD Stadien 2-4 bewusst, um für die prospektive Datenauswertung eine - hinsichtlich der Nierenfunktion - homogenere Patientenkohorte zu definieren.

Eine gemeinsame Limitation aller bisherigen Kohortenstudien einschließlich der CARE FOR HOME Studie ist die nur einmalige Bestimmung von sKlotho bei den Studienteilnehmern. Daher können etwaige Veränderungen von sKlotho im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung nicht intraindividuell verifiziert werden. Vielmehr wird versucht, aus Daten einer Querschnittsuntersuchung einen (patho)physiologischen Ablauf zu rekonstruieren.

#### 4.1.2 Klotho als Prädiktor des renalen- und des Gesamtüberlebens

Nach abschließender Beurteilung der Ergebnisse muss auch die Hypothese, dass sich sKlotho bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung als unabhängiger Prädiktor des renalen- und des Gesamtüberlebens erweist, verworfen werden. In der CARE FOR HOME Studie kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen sKlotho und dem renalen- oder Gesamtüberleben nachgewiesen werden.

Diese Aussage steht im Widerspruch zu Ergebnissen der InCHIANTI-Studie, einer prospektiven Kohortenstudie mit etwa 800 Probanden (> 65 Jahre). sKlotho - welches bei Studienbeginn signifikant mit dem Alter korreliert - prädiziert bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von etwa 6 Jahren nach multivariater Anpassung für Alter, Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels und klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren die Gesamtsterblichkeit <sup>90</sup>. Da weder detaillierte Informationen zur Todesursache noch zum Auftreten sonstiger nicht fataler kardiovaskulärer Ereignisse dargelegt werden, kann der Einfluss von niedrigem sKlotho auf die kardiovaskuläre Prognose nicht abschließend beurteilt werden. Des Weiteren ist kein eingeschlossener Patient jünger als 65 Jahre alt, so dass es nicht überrascht, dass ein Drittel der Probanden eine eGFR von < 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> aufweist. Detailliertere Informationen zur Nierenfunktion der Kohorte sind leider nicht publiziert.

Die CARE FOR HOME Studie wurde im Jahr 2008 gestartet weshalb zum Zeitpunkt der Einreichung der Dissertationsschrift lediglich ein kurzes Nachbeobachtungszeitintervall ausgewertet werden kann. Nach Auswertung der vorliegenden Daten ist es unwahrscheinlich, dass eine längere Nachverfolgung einen statistisch signifikanten und klinisch bedeutsamen Zusammenhang zwischen sKlotho und dem ereignisfreien Überleben von CKD Patienten detektiert.

Zusammenfassend gibt es bis dato nur eine geringe Zahl epidemiologischer Studien, wovon lediglich zwei ein prospektives Design aufweisen. In Tabelle 15 sind die derzeitig verfügbaren Studien und ihre Ergebnisse zur besseren Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 15: Querschnittsuntersuchungen zur Assoziation von sKlotho und Nierenfunktion

	Design	Probanden		Klotho-Messung	Beobachtete Klotho-Spiegel*	Erkenntnis
Yamazaki <i>et al.</i> <sup>77</sup>	CSS	181 gesunde Probanden (Asiaten)	39 Kinder (< 17 J)	Serum	952±282 pg/ml	Alter, Kreatinin, Calcium und Phosphat sind mit sKlotho assoziiert
			142 Erw. (> 20 J)		562±146 pg/ml	
Sugiura <i>et al.</i> <sup>86</sup>	CSS	30 CKD Patienten 10 gesunde Kontrollen		Serum	CKD: 1413±614 pg/ml Kontrolle: 404±87 pg/ml	sKlotho bei CKD erhöht
Shimamura <i>et al.</i> <sup>84</sup>	CSS	292 CKD Patienten		Serum	K/DOQI 1: 1442±1410 pg/ml K/DOQI 2: 616±256 pg/ml	Niedrigeres sKlotho bei CKD 2-5 im Vergleich zu CKD 1
Devaraj <i>et al.</i> <sup>87</sup>	CSS	61 CKD Patienten 82 DM Patienten 30 gesunde CKD Kontrollen 27 gesunde DM Kontrollen		Serum	Krea > 2 mg/dl: 108 ng/ml (66, 182) HbA <sub>1c</sub> ≥ 6,5 %: 35 ng/ml (15, 58)	sKlotho bei CKD erhöht
					Krea < 1,2 mg/dl: 67 ng/ml (43, 119)	sKlotho bei DM vermindert

Pavik <i>et al.</i> <sup>88</sup>	CSS	99 ADPKD Patienten 32 CKD Patienten 12 XLH Patienten 20 gesunde Kontrollen	Serum	ADPKD 1-2: 719±503 pg/ml CKD 1-2: 1037±839 pg/ml	Niedrigstes sKlotho bei Patienten mit ADPKD; negative Korrelation mit Zystenvolumen
				XLH: 1187±569 pg/ml Kontrolle: 1200±385 pg/ml	Keine Korrelation mit Nierenfunktion
Akimoto <i>et al.</i> <sup>89</sup>	CSS	36 ESRD Patienten unter PD 11 gesunde Kontrollen	Serum	PD: 554±210 pg/ml Kontrolle: 783±318 pg/ml	Keine Korrelation mit Nierenrestfunktion
			Im Urin	PD: 303 ng/Tag (84-499) Kontrolle: 1232 ng/Tag (870-1846)	Korrelation mit Nierenrestfunktion
			Im Dialysat	PD: 114 ng/Tag (77-155)	Korrelation mit Albumin im Dialysat

RRF: „residual renal function“, Nierenrestfunktion; CSS: „cross-sectional study“, Querschnittsstudie; POCS: „prospective observational cohort study“, Prospektive nicht-interventionelle Kohortenstudie; CKD: „chronic kidney disease“, Chronische Nierenerkrankung; ADPKD: „autosomal dominant polycystic kidney disease“, Autosomal-dominate polyzystische Nierenerkrankung; XLH: „X-linked hypophosphataemia“, X-chromosomal vererbte Hypophosphatämie, PD: Peritonealdialyse; DM: Diabetes Mellitus

\* Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung resp. Median (25. Perzentile, 75. Perzentile).

### 4.1.3 Klotho in Gewebe und Urin

Mit dem CARE FOR HOME Studiendesign lässt sich keine Aussage über das Verhältnis von in Gewebe exprimiertem Klotho, Klotho im Urin und sKlotho im Plasma treffen, da in unserer Studie lediglich eine Bestimmung von Klotho im Plasma vorgenommen wird.

Hu *et al.* beschreiben einen Abfall von Klotho im Urin in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung bei 40 CKD Patienten <sup>73</sup>. Beobachtungen im Tiermodell geben Grund zu der Annahme, dass ein Klothomangel Nierenschädigungen <sup>67,74</sup> und Weichteilgewebsverkalkungen beschleunigt <sup>73</sup>. Die Analyse membrangebundenen Klothos erfordert eine Nierenbiopsie und ist somit in großen prospektiven Studien wie der CARE FOR HOME Studie kaum durchzuführen. Jedoch beschreiben tierexperimentelle und klinische Arbeiten mit Durchführung von Nierenbiopsien und nachfolgendem immunhistochemischem Nachweis membrangebundenen Klothos, dass membrangebundenes Klotho bereits in sehr frühen Stadien der CKD erniedrigt ist <sup>72,91,92</sup>.

## 4.2 Bedeutung von FGF-23 in der chronischen Nierenerkrankung

Neben sKlotho werden in dieser Arbeit weitere Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels wie die fraktionelle Phosphatausscheidung im Urin (FePi), Parathormon (PTH) und der Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) auf ihre prädiktiven Eigenschaften analysiert. Während sich in der univariaten Analyse - im Gegensatz zu sKlotho - PTH, FePi und FGF-23 als statistisch signifikante Prädiktoren des ereignisfreien Überlebens darstellen, bestätigt im multivariaten Modell nach Korrektur für Alter, Nierenfunktion (eGFR) und logarithmierte Albuminurie lediglich FGF-23 seine prädiktiven Eigenschaften auf signifikantem Niveau.

### 4.2.1 Epidemiologische Bedeutung von FGF-23

Im Einklang mit unseren Ergebnissen können FGF-23 in weiteren prospektiven Studien bei nicht-dialysepflichtigen CKD Patienten prädiktive Funktionen zugeschrieben werden. Zunächst ist FGF-23 sowohl bei Patienten mit makroalbuminurischer diabetischer Nephropathie<sup>93</sup> als auch bei Patienten mit nicht-diabetischer CKD<sup>43</sup> unabhängiger Prädiktor für das Voranschreiten der CKD<sup>43,93</sup>. Dabei übertraf FGF-23 Serum-Phosphatspiegel als renaler Progressionsmarker<sup>43</sup>.

Die Ergebnisse dieser Pionierstudien wurden nachfolgend in großen Multizenter-Studien überprüft, die zudem FGF-23 als Prädiktor für das Gesamtüberleben testen: In der CRIC-Studie erweist sich FGF-23 in einer Kohorte von fast 4.000 CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 2-4 als unabhängiger Prädiktor des Gesamtüberlebens, während es nur bei Patienten in früheren CKD Stadien auch ein unabhängiger renaler Prädiktor ist. Hingegen erweist sich in der HOST Studie bei 1.099 Patienten mit einer CKD im fortgeschrittenen Stadium FGF-23 wiederum als unabhängiger Prädiktor von Gesamt- und dialysefreiem Überleben<sup>44</sup>.

In der WHAS Studie erweist sich FGF-23 bei 701 körperlich beeinträchtigten Frauen, die bei Einschluss älter als 65 Jahre alt waren, als unabhängiger Prädiktor für das Neuauftreten einer chronischen Nierenerkrankung bei einer Nachbeobachtungszeit von 18 Monaten<sup>94</sup>.

Nur zwei Arbeiten untersuchten FGF-23 Spiegel bisher als Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse bei chronisch nierenkranken Menschen; beide stellen jedoch einen Zusammenhang zwischen erhöhtem FGF-23 und dem Erleiden eines kardiovaskulären Ereignisses vor Erreichen der Dialysepflichtigkeit fest<sup>44,47</sup>. Diese Ergebnisse werden in Subgruppenanalysen der CHS Studie bestätigt: So war FGF-23 bei 1.128 Studienteilnehmern, die bei Studieneinschluss eine eGFR < 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> aufweisen, unabhängiger Prädiktor für Gesamtmortalität, Herzinsuffizienz und kardiovaskuläre Ereignisse<sup>95</sup>.

Die prädiktiven Eigenschaften von FGF-23 lassen sich auch auf das dialysepflichtige Patientenkollektiv übertragen<sup>48,96</sup>. In der ArMORR Studie zeigen inzidente Dialysepatienten mit den höchsten FGF-23 Spiegel eine um den Faktor 6 erhöhte Mortalitätsrate (Vergleich oberste vs. unterste Quartile)<sup>48</sup>. Diese Aussage gilt ebenso für prävalente Dialysepatienten<sup>96</sup>.

Diese Studien inspirierten mehrere Arbeitsgruppen, die prognostische Bedeutung von FGF-23 selbst bei nierengesunden Menschen zu untersuchen. So schreibt die „Heart and Soul“-Studie FGF-23 unabhängige prädiktive Eigenschaften bezüglich Mortalität sowie dem Erleiden eines kardiovaskulären Ereignisses auch bei Patienten mit prävalenter koronarer Herzkrankheit und erhaltener Nierenfunktion zu <sup>97</sup>. Auch in der PEACE Studie kann FGF-23 in einer Kohorte von 1.100 Patienten mit stabiler Koronarerkrankung über ein Beobachtungsintervall von 5 Jahren ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines kardiovaskulären Todes und Herzinsuffizienz zugeschrieben werden <sup>98</sup>.

Allerdings kann die „Health Professionals Follow-up“-Studie diese Beobachtung nicht bestätigen; innerhalb eines Kollektives von 1.259 Menschen ohne prävalente renale oder kardiovaskuläre Erkrankung weist FGF-23 über eine Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren keine prädiktiven Eigenschaften bezüglich des Auftretens nicht-fataler Myokardinfarkte und fataler koronarer Ereignisse auf <sup>99</sup>.

Die CHS Studie identifiziert FGF-23 bei 1.979 nicht-CKD Patienten, die bei Studienbeginn mindestens 65 Jahre alt waren, über ein Nachbeobachtungsintervall von 10 Jahren als unabhängigen Prädiktor für das Neuauftreten einer Herzinsuffizienz, nicht jedoch eines kardiovaskulären Ereignisses <sup>95</sup>.

Diese diskrepanten Ereignisse lassen sich zumindest partiell durch unterschiedliche Definitionen der gewählten Studienendpunkte erklären. So fällt nach Aufschlüsselung der Einzelkomponenten der kombinierten Endpunkte auf, dass FGF-23 atherosklerotische Ereignisse (Myokardinfarkt, zerebrale Insulte) meist weniger eindeutig vorhersagt als myokardiale Ereignisse (Herzversagen).

Die epidemiologischen Daten zur Bedeutung von FGF-23 für chronisch nierenkranke Menschen sind in Tabelle 16, bei Patienten mit erhaltener Nierenfunktion in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 16: Prospektive Kohortenstudien zur prognostischen Bedeutung von FGF-23 bei CKD Patienten

	Design	Probanden	Follow-up (Median)	Endpunkt(e)		Prädiktiver Nutzen von FGF-23
Fliser <i>et al.</i> <sup>43</sup>	POCS	227 nicht-diabetische CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 1-5	4,4 Jahre	Renaler Endpunkt (Verdopplung Serumkreatinin und / oder Einleitung RRT)		+ +
Isakova <i>et al.</i> <sup>49</sup>	POCS	3.879 CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 2-4	5 Jahre	Renaler Endpunkt	eGFR > 30 ml/min	+ +
					eGFR < 30 ml/min	- -
				Gesamtmortalität		+ +
Kendrick <i>et al.</i> <sup>44</sup>	POCS	1.099 CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 4-5 ND	2,9 Jahre	CV Ereignis (MI, Insult, Amputation)		+ +
				Einleitung RRT		+ +
				Gesamtmortalität		+ +
Gutierrez <i>et al.</i> <sup>48</sup>	NCCS	400 inzidente Hämodialysepatienten	1 Jahr	Gesamtmortalität		+ +
Jean <i>et al.</i> <sup>96</sup>	POCS	219 prävalente Hämodialysepatienten	2 Jahre	Gesamtmortalität		+ +



Seiler <i>et al.</i> <sup>100</sup>	POCS	149 CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 1-5 ND	4,9 Jahre	CV Ereignis (MI, PTCA, Bypass, cerebraler Insult mit Symptomen > 24h, Stent oder Endarterektomie der Carotiden, nicht-traumatische Extremitätenamputation, peripherer Stent / PTA, Tod	+ +
Nakano <i>et al.</i> <sup>101</sup>	POCS	738 CKD Patienten in den K/DOQI Stadien 1-5 ND	4,4 Jahre	Fatales oder nicht-fatales CV Ereignis mit notwendiger Hospitalisierung	+ +
CHS <sup>95</sup>	POCS	1.128 CKD Patienten **	10 Jahre	Gesamtmortalität	+ +
				Inzidenz HI	+ +
				Inzidenz CVD	+ +

Tabelle 17: Prospektive Kohortenstudien zur prognostischen Bedeutung von FGF-23 in nicht-CKD Kollektiven

	Design	Probanden	Follow-up (Median)	Endpunkt(e)	Prädiktiver Nutzen von FGF–23
HPFS <sup>99</sup>	NCCS	1.259 Probanden ohne prävalente CVD	10 Jahre	Nicht-fataler MI oder Fatale CAD	- -
WHAS <sup>102</sup>	POCS	701 körperliche beeinträchtigte Frauen	18 Monate	Inzidenz CKD *	+ +
				Mortalität (jeden Grundes / spez.	- -
Heart and Soul <sup>97</sup>	POCS	833 Patienten mit stabiler CAD	6 Jahre	Mortalität jeden Grundes	+ +
				CV Event (MI, HI, Insult / TIA)	+ +
				MI	- -
				HI	+ +
				Insult / TIA	+ +
PEACE <sup>98</sup>	NCCS	1.100 Patienten mit stabiler CAD ohne höhergradige Einschränkung der LV Funktion	5 Jahre	CV Tod / HI	+ +
				MI	-
				Insult	-

CHS <sup>95</sup>	POCS	1.979 Nicht-CKD Patienten <sup>**</sup>	10 Jahre	Inzidenz HI	+ +
				Inzidenz CVD	-
HOM SWEET HOMe	POCS	1.309 Patienten vor elektiver Koronarangiographie	Andauernd	Nicht-hämorrhagischer Insult / MI / CV Tod	

Notiz: Aufgeführt sind Studien, die nicht selektiv Patienten mit chronischer Nierenerkrankung rekrutiert haben.

NSSC: "Nested case-control study", Fall-Kontroll-Studie, bei der die Fälle und Kontrollen aus der Population einer Kohortenstudie gezogen werden; POCS: „prospective observational cohort study“, Prospektive nicht-interventionelle Kohortenstudie; ND: Dialysepatienten ausgeschlossen; CVD: "cardiovascular disease", Kardiovaskuläre Erkrankung; CAD: "coronary artery disease", Erkrankung der Koronararterien; LV: links ventrikulär; MI: Myokardinfarkt; CKD: "chronic kidney disease", Chronische Nierenerkrankung; HI: Herzinsuffizienz; TIA: Transitorisch ischämische Attacke, PTCA: „Perkutane transluminale Coronarangioplastie“.

HPFS: „Health Professional Follow-Up Study“; WHAS: „Women's Health and Aging Study“; PEACE: „Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition“; CHS: „Cardiovascular Health Study“.

Prädiktive Aussagekraft von FGF-23: - keine prädiktive Aussagekraft nach univariater Analyse; - - keine prädiktive Aussagekraft nach multivariater Analyse; + + prädiktive Aussagekraft nach multivariater Analyse.

\* Analyse beruht auf 307 Probanden ohne CKD zu Studienbeginn.

\*\* Insgesamt wurden 3,107 Probanden > 65 Jahre rekrutiert.

#### 4.2.2 Pathophysiologische Folgen erhöhter FGF-23 Plasmaspiegel

Der epidemiologische Zusammenhang von FGF-23 und unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen wirft die Frage auf, inwieweit FGF-23 ein passiver Risikomarker ist, oder als Mediator selbstständig kardiovaskuläre Schädigungen induziert <sup>100,103,104</sup>.

So lassen sich die drastisch erhöhten Mortalitätsraten bei Menschen mit erhöhten FGF-23 Spiegel zunächst auch dadurch erklären, dass erhöhtes FGF-23 eine Dysbalance anderer Parameter des Calcium-Phosphat-Haushaltes reflektiert. Ein zentrales Problem der chronischen Nierenerkrankung ist die progredient nachlassende Fähigkeit der Niere, adäquate Mengen Phosphat zu eliminieren. In der Folge steigen Serum-Phosphatspiegel, welche der Organismus durch vermehrte Bildung des phosphaturischen Hormons FGF-23 beantwortet. FGF-23 inhibiert die intestinale Phosphataufnahme, vermindert die Rückresorption von Phosphat in der Niere und hemmt die Aktivierung von Vitamin D, woraus eine weitere Reduktion der intestinalen Aufnahme von Phosphat resultiert. Gleichzeitig führt eine verminderte Vitamin D Aktivierung zu einer verminderten intestinalen Calciumaufnahme, welche in niedrigeren Calcium-Serumspiegeln und nachfolgend einer Stimulation der Parathormon Freisetzung aus der Nebenschilddrüse mündet, wodurch die renale Calciumausscheidung gehemmt und eine Hypokalzämie verhindert wird.

Erhöhte Serum-Phosphatspiegel und ein erhöhtes Calcium Phosphatprodukt führen zu frühzeitig einsetzenden vaskulären Calcifizierungsprozessen <sup>105-107</sup>. Darüber hinaus induziert Phosphat pathologische Umbauprozesse der Herzklappen <sup>108</sup> und des Myokards, die zu einer linksventrikulären Hypertrophie führen <sup>109</sup>.

Etliche Studien haben epidemiologisch aufgezeigt, dass bei nierenkranken Menschen eine Hyperphosphatämie mit einer erhöhten kardiovaskulären Ereignisrate und Mortalität assoziiert ist <sup>6,107,110,111</sup>. Darüber hinaus sind selbst bei nierengesunden Menschen Serumphosphatwerte im hoch-normalen (vermeintlich noch physiologischen) Bereich ungünstige Prognosemarker <sup>112</sup>.

Da eine erhöhte Phosphatbelastung die FGF-23 Freisetzung induziert, verwundert zunächst nicht, dass erhöhte FGF-23 Werte ebenso ungünstige Prognosemarker sind. Jedoch persistiert diese prognostische Aussage von FGF-23 auch nach Adjustierung für Plasma-Phosphatspiegel in multivariaten Regressionsmodellen <sup>43,44,48,49,93-98,100,101,113</sup>. Daher wurde bereits frühzeitig postuliert, dass FGF-23 eigenständig kardiovaskuläre Schädigungen induzieren könnte - sei es

indirekt durch Verminderung der Bildung des präsumptiv protektiven Calcitriols oder aber direkt.

Gegen eine solche direkt schädigende Wirkung wurde zunächst eingewendet, dass FGF-23 für seine zellulären Wirkungen den Co-Rezeptor Klotho benötigt, der selektiv in Niere und Nebenschilddrüse, nicht jedoch in Myokardzellen exprimiert wird. Diese Ansicht musste revidiert werden, nachdem Faul *et al.* im Jahr 2011 erstmals im Mausmodell Klotho-unabhängige kardiovaskuläre Effekte von FGF-23 nachweisen konnte. So induzierte FGF-23 sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* über eine Aktivierung des PLC $\gamma$  Signalweges eine Hypertrophie von Kardiomyozyten. Durch Inhibition von FGF-23 konnte umgekehrt das Auftreten einer Myokardhypertrophie in einem murinen Modell der chronischen Nierenerkrankung verhindert werden. Da eine Myokardhypertrophie langfristig zur chronischen Myokardinsuffizienz prädisponiert, ermöglichen diese experimentellen Daten von Faul *et al.* das Verständnis von epidemiologischen Untersuchungen, die einerseits in Querschnittsanalysen Assoziationen zwischen erhöhtem FGF-23 und eingeschränkter LV Funktion beschreiben<sup>100</sup>, andererseits in prospektiven Studien FGF-23 als Prädiktor für das Auftreten eines Herzversagens erkennen<sup>95,97</sup>.

#### 4.2.3 FGF-23 und Diuretikatherapie

Neben solchen direkten pathophysiologischen Signalkaskaden können zusätzliche Einflussvariablen zur epidemiologischen Assoziation zwischen erhöhtem FGF-23 und Myokardinsuffizienz beitragen. Ein solcher möglicher Einflussfaktor ist eine Diuretikamedikation, welche ein Standardtherapeutikum für herzinsuffiziente Patienten ist und gleichzeitig direkt den Calcium-Phosphat-Haushalt beeinflusst. Dies nehmen wir zum Anlass einer Subgruppenanalyse der CARE FOR HOME Studie, um einen möglichen Einfluß der Diuretikamedikation auf FGF-23 zu erfassen.

Wir erkennen signifikant höhere FGF-23 Spiegel bei Patienten, die mit einem Schleifendiuretikum therapiert werden, im Vergleich zu Patienten, die ein Thiaziddiuretikum erhalten. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch die von Schleifendiuretika induzierte erhöhte fraktionelle Ausscheidung von Calcium im Urin erklären <sup>114</sup>. Zur Verhinderung einer Hypocalcämie erfolgt eine Steigerung der Parathormonsekretion, welches seinerseits die Sekretion von FGF-23 aus Osteoblasten stimuliert <sup>115</sup>. Gegensätzlich zur Wirkung der Schleifendiuretika geht die Einnahme eines Thiaziddiuretikums mit einer erniedrigten fraktionellen Calciumausscheidung im Urin einher <sup>114</sup>, was den ausbleibenden Anstieg der FGF-23 Spiegel unter Medikation mit Thiaziddiuretika erklärt.

### 4.3 Zusammenfassung

Unsere CARE FOR HOME Studie untersucht erstmals die Bedeutung von sKlotho in einer detailliert charakterisierten Kohorte von chronisch nierenkranken Menschen.

Entgegen den initial aufgestellten Hypothesen besteht bei Studieneinschluss kein Zusammenhang von sKlotho mit der Nierenfunktion oder mit klassischen Parametern des Calcium-Phosphatstoffwechsels. Weiterhin weist sKlotho, entgegen unserer Hypothese, keine prädiktiven Eigenschaften bezüglich des dialysefreien Überlebens auf. Einerseits weitere experimentelle Daten, andererseits prospektive Studien mit größeren Kollektiven und vor allem eine Validation des sKlotho ELISA Kits werden nötig sein, um eine fundierte Aussage über die Funktion sKlothos zu treffen <sup>116</sup>.

Im Gegensatz zu sKlotho ist FGF-23 einerseits mit der Nierenfunktion bei Studienbeginn assoziiert, andererseits ist FGF-23 in der multivariaten Regressionsanalyse unabhängiger Prädiktor des renalen Überlebens und des Gesamtüberlebens womit Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden <sup>43,44,49,49,93,94,100</sup>.

### 4.4 Ausblick

Nachdem sich in der CARE FOR HOME Studie FGF-23 bei Vergleich verschiedener Komponenten der CKD-MBD als bester Prädiktor des Voranschreitens der chronischen Nierenerkrankung erweist, kann postuliert werden, dass für zukünftig therapeutische Interventionen bei chronisch nierenkranken Menschen FGF-23 eher als etwa sKlotho als prognostisch sinnvoller Zielparameter betrachtet werden kann.

Derzeitig verfügbare Therapiekonzepte zur pharmakologischen Beeinflussung der FGF-23 Spiegel *in vivo* bestehen im Einsatz von Phosphatbindern, welche durch eine Hemmung der intestinalen Phosphataufnahme konsekutiv FGF-23 im Serum senken. Daten aus Tierstudien <sup>117</sup> oder des Menschen <sup>118-120</sup> zeigen, dass durch die Einnahme von Phosphatbindern FGF-23 Spiegel reduziert werden. Ob eine solche Senkung von FGF-23 durch Phosphatbinder mit einem prognostischen Benefit assoziiert ist, müssen zukünftige klinische Interventionsstudien überprüfen. Interessanterweise zeigen Daten der ArMORR Kohorte, dass eine Therapie mit

Phosphatbindern mit einer verminderten 1-Jahres-Todesrate bei Dialysepatienten einhergeht<sup>18</sup>. Da dieser Effekt in der ArMORR Kohorte unabhängig von den gemessenen Serum-Phosphatspiegeln beobachtet wird, kann postuliert werden, dass über den direkten phosphatsenkenden Effekt hinaus eine Senkung von FGF-23 zum beobachteten Benefit von Phosphatbindern in der ArMORR Kohorte beigetragen haben könnte.

Des Weiteren befinden sich derzeit als neuer Therapieansatz FGF-23 Antikörper in der Erprobung<sup>121,122</sup>. Bisher verfügbare tierexperimentelle Ergebnisse zum Einsatz von FGF-23 Antikörpern reflektieren einerseits die physiologische Funktion von FGF-23 im Calcium-Phosphat-Haushalt, da der Einsatz von FGF-23 Antikörpern in erhöhten Phosphat- und Vitamin D-Spiegeln mündet<sup>123</sup>. Andererseits zeigen Aono *et al.* im Mausmodell bei hypophosphatämischer Rachitis einen therapeutischen Benefit durch Einsatz von FGF-23 Antikörpern, indem die Tiere eine Verbesserung der Muskelschwäche als auch der täglichen Aktivität zeigen<sup>124</sup>. Daten zum Einsatz von FGF-23 Antikörpern in der chronischen Nierenerkrankung liegen bisher noch nicht vor.

Zukünftige Interventionsstudien auf diesem Gebiet werden aufzeigen müssen, welchen prognostischen Effekt eine selektive Antagonisierung von FGF-23 erbringt, da - anders als bei Einsatz von Phosphatbindern - dieser Therapieansatz durch Inhibition der phosphaturischen FGF-23 Wirkung von einem Anstieg der Phosphatspiegel im Serum begleitet wird<sup>123</sup>.



## 5. Anhang

### 5.1 Einverständniserklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,  
im Rahmen Ihres ambulanten Besuches in unserer Abteilung laden wir Sie ein, an einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen Entzündungsparametern im Blut, Gefäßverkalkung (Atherosklerose) und chronischer Nierenerkrankung teilzunehmen.

Hierzu benötigen wir Ihre Erlaubnis, eine Urinprobe und eine Blutprobe (54 ml) für Laboruntersuchungen zu verwenden. Zusätzlich möchten wir Sie bitten, einen standardisierten Fragebogen zu Risikofaktoren und klinischen Zeichen einer Herz-Kreislauferkrankung durchzuführen. Der Zeitaufwand für diesen Fragebogen beträgt etwa 10 Minuten. Schließlich möchten wir gerne bei Ihnen eine ausführliche Ultraschalluntersuchung von Nieren- und Milzdurchblutung, Herzfunktion und Gefäßwänden durchführen, die etwa 60 Minuten dauern wird. Diese Ultraschalluntersuchung ist mit keinerlei Strahlenbelastung verbunden.

Innerhalb der ersten 5 Jahre nach dieser Untersuchung möchten wir nochmals mit Ihnen und / oder Ihrem betreuenden Arzt jährlich Kontakt aufnehmen, um uns über Ihren Gesundheitszustand zu erkundigen. Darüber hinaus möchten wir Ihnen zu diesen Zeitpunkten noch einmal eine Blutprobe (18 ml) entnehmen und Sie um eine Urinprobe bitten.

Selbstverständlich ist die Teilnahme an dieser Untersuchung für Sie freiwillig. Wenn Sie mit der Teilnahme an unserer Untersuchung nicht einverstanden sind, entstehen Ihnen selbstverständlich keinerlei Nachteile in der medizinischen Behandlung.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen jederzeit persönlich zur Verfügung.

---

Mit der Untersuchung bin ich

☐ einverstanden

☐ nicht einverstanden

Homburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)

## 5.2 Datenschutzerklärung

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Studie folgende, freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d. h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern bei den Prüfarzten der beteiligten Klinik - Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums des Saarlandes - aufgezeichnet werden. Weiterhin erkläre ich mich einverstanden, dass im Rahmen von externen Überprüfungen wie etwa durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes Einsicht in meine Daten gewährt werden kann.
2. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen die meine personenbezogenen Daten - insbesondere Gesundheitsdaten - gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Name: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_

### 5.3 Fragebogen kardiovaskuläres Risiko

1. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?  
☐ Ja  
☐ Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)
2. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Bergangehen oder raschen Gehen?  
☐ Ja  
☐ Nein (*falls Nein, weiter mit Frage 9*)  
☐ Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.
3. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?  
☐ Ja  
☐ Nein
4. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?  
☐ Ich halte an oder laufe langsamer  
☐ Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 9*)  
*Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen.*
5. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?  
☐ Es kommt zu einer Erleichterung  
☐ Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)
6. Wie rasch?  
☐ Innerhalb von 10 Minuten.  
☐ Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).
7. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.  
☐ Sternum (oberes oder mittleres Drittel)  
☐ Sternum (unteres Drittel)  
☐ Linksseitige vordere Brustwand  
☐ Linker Arm  
*(alle Angaben notieren)*
8. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonst irgendwo?  
☐ Ja (Notieren wo \_\_\_\_\_)

O Nein

9. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes, der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

O Ja

O Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Bein?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (*weiter Frage 19*)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

O Ich halte an oder laufe langsamer

O Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 19*)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

O Es kommt zu einer Erleichterung

O Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 19*)

18. Wie rasch?

O Innerhalb von 10 Minuten.

☐ Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

19.a (14.04.2011 hinzugefügt) Wurden Sie in den letzten 24 Monaten aufgrund einer anderen Herzerkrankung, z B Herzschwäche mit Wassereinlagerungen in Lunge oder Beinen, stationär aufgenommen?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

19b. In welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

20. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

21. Hatten Sie in den letzten zwei Jahren einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

22. Sind Ihre Halsschlagadern in den letzten zwei Jahren operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern in den letzten zwei Jahren mittels Bypass operiert oder aufgedehnt worden (dies umfasst keine Krampfader-OP)?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

24. Ist bei Ihnen in den letzten zwei Jahren eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung diagnostiziert worden?

☐ Ja Details (Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)\_\_\_\_\_

☐ Nein

25. Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?

☐ Ja, ohne Fieber >38,5°C Details \_\_\_\_\_

☐ Ja, mit Fieber  $>38,5^{\circ}\text{C}$       Details \_\_\_\_\_

☐ Nein

26. Haben Sie in den letzten zwei Jahren geraucht?

☐ Ja

☐ Nein (*weiter mit Frage 29*)

27. Rauchen Sie aktuell?

☐ Ja (*weiter mit Frage 29*)

☐ Nein

28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

\_\_\_\_\_

29. Ist bei Ihnen in den letzten zwei Jahren ein Diabetes mellitus diagnostiziert worden?

☐ Ja

☐ Nein (*weiter mit Frage 31*)

30. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

☐ Insulin

☐ blutzuckersenkende Tabletten

☐ Diät

31. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mind. 30 min sportlich in einem Ausmaß, daß Sie ins Schwitzen kommen? (falls „0“, weiter Frage 33a)

32. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

\_\_\_\_\_

32a. Wie viele Stunden täglich schauen Sie unter der Woche (werktags, Mo-Fr) fern?

\_\_\_\_\_

32b. Wie viele Stunden täglich schauen Sie am Wochenende (Sa-So) fern?

\_\_\_\_\_

33a. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme über mindestens acht Stunden nüchtern (nüchtern schließt Nahrung und Kaffee aus)?

☐ Ja

☐ Nein

33b. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wieviele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 0,35 l Bier, 0,120 l (ein „Achtel“) Wein oder 45 ml Spirituosen als ein Glas Alkohol.

Gesamt \_\_\_\_\_ Gläser  
 Bier \_\_\_\_\_ Gläser  
 Rotwein \_\_\_\_\_ Gläser  
 Weißwein \_\_\_\_\_ Gläser  
 Spirituosen \_\_\_\_\_ Gläser

34. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?

☐ Ja

☐ Nein

35. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

36. Mit wem dürfen wir in einem, drei und fünf Jahren telefonischen Kontakt aufnehmen, um uns nach Ihrem Gesundheitszustand zu erkundigen?

Mit Angehörigen	<input type="radio"/>	Ja	Name	_____	_____
			Telefonnummer	_____	_____
	<input type="radio"/>	Nein			
Mit Hausarzt	<input type="radio"/>	Ja	Name	_____	_____
			Telefonnummer	_____	_____
	<input type="radio"/>	Nein			

37. Hatten Sie jemals einen Knochenbruch?

Detail (Wo, Warum ; Krankenhaus, Zeitraum, Beschwerden...)?

38. War die 24 h Urinsammlung komplett?

Gewicht \_\_\_\_\_ Gemessen!

Hüft- \_\_\_\_\_ Taillenumfang \_\_\_\_\_

Hautfalten \_\_\_\_\_ mm Triceps \_\_\_\_\_ mm Biceps \_\_\_\_\_ mm Suprailiacal \_\_\_\_\_ mm

Subskapulär \_\_\_\_\_ mm

Umfang Oberarm \_\_\_\_\_ cm

EKG

Blutdruck bds nach 5 min Sitzen

Re \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Li \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Raum verlassen!

1 min \_\_\_\_ / \_\_\_\_

2 min \_\_\_\_ / \_\_\_\_

3 min \_\_\_\_ / \_\_\_\_

4 min \_\_\_\_ / \_\_\_\_

5 min \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---



### 5.4 Fragebogen Follow-up (telefonisch)

Sehr geehrte Frau / Herr,

mein Name XXX, ich bin Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Im Jahr 20\_\_ haben Sie sich in ambulanter Behandlung der Nieren- und Hochdruckambulanz des Universitätsklinikums Homburg befunden. Freundlicherweise erlaubten Sie damals gegenüber unserer Mitarbeiterin Frau Herath / Weihrauch, dass wir Sie nach zwei Jahren erneut kontaktieren dürfen, um Ihnen telefonisch einige Fragen zu Ihrem Gesundheitszustand zu stellen. Haben Sie jetzt Zeit, gemeinsam mit mir diese Fragen zu beantworten?

Das ist sehr freundlich von Ihnen.

1. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_/\_\_/20\_\_ einen (erneuten) Herzinfarkt?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

1a. In welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

2. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_/\_\_/20\_\_ eine (erneute) Bypass-Operation?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

2a. In welchem Krankenhaus erfolgte die Operation?

3. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_/\_\_/20\_\_, eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

3a. In welchem Krankenhaus erfolgte die Untersuchung?

4. Hatten Sie in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_/\_\_/20\_\_, einen

Schlaganfall mit Störungen des Sprachzentrums, Lähmungen oder Gefühlsverlusten der Gliedmaßen, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

☐ (Nein, aber TIA am \_\_\_\_\_)

4a. In welchem Krankenhaus erfolgte die Behandlung?

\_\_\_\_\_

4b. Welche Beschwerden hatten Sie im Rahmen dieses Schlaganfalles?

\_\_\_\_\_

4c. Wie lange hielten diese Beschwerden an?

\_\_\_\_\_

5. Sind Ihre Halsschlagadern in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_, operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

☐ Ja, OP, am \_\_\_\_\_

☐ Ja, Intervention, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

5a. In welchem Krankenhaus erfolgte die Operation oder Aufdehnung?

6. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern in den letzten 24 Monaten, also seit dem \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ mittels Bypass operiert oder mittels Katheter aufgedehnt? (*Hierbei sind keine Operationen von „Krampfadern“ gemeint!*)

☐ Ja, OP, am \_\_\_\_\_ Art OP \_\_\_\_\_

☐ Ja, Intervention, am \_\_\_\_\_ Art Intervention \_\_\_\_\_

☐ Nein

7. Waren sonstige Operationen an den Beinen oder Füßen erforderlich?

☐ Ja, Amputation, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

8. (21.09.2009 hinzugefügt) Wurden Sie in den letzten 24 Monaten aufgrund einer anderen Herzerkrankung, z B Herzschwäche mit Wassereinlagerungen in Lunge oder Beinen, stationär aufgenommen?

☐ Ja, am \_\_\_\_\_

☐ Nein

8. a In welchem Krankenhaus erfolgte die stationäre Behandlung?

9. (hinzugefügt am 19.01.2010) Hatten Sie jemals einen Knochenbruch?

9. a Bitte schildern Sie uns die Umstände dieses Knochenbruches?

9. b Wo wurde dieser ambulant versorgt?

9. c Wo wurde dieser Stationär versorgt?)

10. . Ist bei Ihnen in den letzten zwei Jahren eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung diagnostiziert worden?

11. Wer betreut Sie momentan hinsichtlich Ihrer Nierenerkrankung?

Dr. \_\_\_\_ in \_\_\_\_

12. Wann sind das letzte Mal die Nierenwerte (Kreatinin) bestimmt worden?

\_\_\_\_.\_\_\_\_.201\_\_

13. Wer hat diese BE durchgeführt?

Dr. \_\_\_\_ in \_\_\_\_

(nur falls kein Nephrologe) Wir würden uns freuen, in den nächsten Wochen nochmals eine nierenfachärztliche Kontrolle bei Ihnen durchführen zu lassen. Sind Sie damit einverstanden? Wir könnten direkt einen Termin vereinbaren...)

Vielen Dank für Ihre freundliche Mitarbeit. Sofern Sie einverstanden sind, möchten wir Sie gerne in den nächsten Jahren noch einmal kontaktieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Seiler S, Wen M, Roth HJ, et al. Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. *Kidney International* 2012; doi:10.1038/ki.2012.288.
2. Seiler, S., Cremers, B., Rebling, N. M., et al. The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *European Heart Journal* 2011, 32(21), 2688-2696.
3. Kramer H. The National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) Grant Initiative: moving clinical practice forward. *Am J Kidney Dis* 2010;55(3):411-4.
4. Frei U. Schober-Halstenberg,(2008): Nierenersatztherapie in Deutschland, bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSie-Niere, Bundesverband Niere eV, Mainz 2008;
5. de Jager DJ, Grootendorst DC, Jager KJ, et al. Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality Among Patients Starting Dialysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2009;302(16):1782-9.
6. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):520-8.
7. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, 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):519-30.
8. Wald R, Sarnak MJ, Tighiouart H, et al. Disordered mineral metabolism in hemodialysis patients: an analysis of cumulative effects in the Hemodialysis (HEMO) Study. *Am J Kidney Dis* 2008;52(3):531-40.

9. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney International* 2007;72(8):1004-13.
10. Fellström B, Zannad F, Schmieder R, et al. Effect of rosuvastatin on outcomes in chronic haemodialysis patients-design and rationale of the AURORA study. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2005;6(1):9.
11. Wanner C, Krane V, März W, et al. Randomized controlled trial on the efficacy and safety of atorvastatin in patients with type 2 diabetes on hemodialysis (4D study): demographic and baseline characteristics. *Kidney Blood Press Res* 2004;27(4):259-66.
12. Zannad F, Kessler M, Leheret P, et al. Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney International* 2006;70(7):1318-24.
13. Locatelli F. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 2003;348(15):1491-4; authorreply1491-4.
14. Rao M, Pereira BJG. Prospective trials on anemia of chronic disease: The Trial to Reduce Cardiovascular Events with Aranesp® Therapy (TREAT). *Kidney International* 2003;64(s87):12-9.
15. Singh AK, Szczech L, Tang KL, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006;355(20):2085-98.
16. Cunningham J, Danese M, Olson K, Klassen P, Chertow GM. Effects of the calcimimetic cinacalcet HCl on cardiovascular disease, fracture, and health-related quality of life in secondary hyperparathyroidism. *Kidney International* 2005;68(4):1793-800.
17. Chertow GM, Pupim LB, Block GA, et al. Evaluation of Cinacalcet Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE): rationale and design overview. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2007;2(5):898-905.
18. Isakova T, Gutiérrez OM, Chang Y, et al. Phosphorus binders and survival on hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009;20(2):388-96.

19. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, et al. Molecular Insights into the Klotho-Dependent, Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. *Molecular and Cellular Biology* 2007;27(9):3417-28.
20. Yamashita T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 2005;9(4):313-8.
21. Kazama JJ, Gejyo F, Shigematsu T, Fukagawa M. Role of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* 2005;9(4):328-30.
22. Ketteler M, Biggar PH. As nature did not predict dialysis--what we can learn from FGF23 in end-stage renal disease? *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009;24(9):2618-20.
23. Riminucci M. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest* 2003;112(5):683-92.
24. Khosravi A, Cutler CM, Kelly MH, et al. Determination of the Elimination Half-Life of Fibroblast Growth Factor-23. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92(6):2374-7.
25. Miyamoto K-I, Segawa H, Ito M, Kuwahata M. Physiological Regulation of Renal Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters. *JJP* 2004;54(2):93-102.
26. Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, Quigley R. Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney International* 2005;68(3):1148-53.
27. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(9):5372-7.
28. Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K-I. Differential effects of Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(6):F1271-8.
29. Bai X. Transgenic Mice Overexpressing Human Fibroblast Growth Factor 23

- (R176Q) Delineate a Putative Role for Parathyroid Hormone in Renal Phosphate Wasting Disorders. *Endocrinology* 2004;145(11):5269-79.
30. Larsson T. Transgenic Mice Expressing Fibroblast Growth Factor 23 under the Control of the  $\alpha 1(I)$  Collagen Promoter Exhibit Growth Retardation, Osteomalacia, and Disturbed Phosphate Homeostasis. *Endocrinology* 2004;145(7):3087-94.
  31. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res* 2003;19(3):429-35.
  32. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *The FASEB Journal* 2006;20(6):720-2.
  33. Shimada T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004;113(4):561-8.
  34. Stubbs JR, Liu S, Tang W, et al. Role of Hyperphosphatemia and 1,25-Dihydroxyvitamin D in Vascular Calcification and Mortality in Fibroblastic Growth Factor 23 Null Mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007;18(7):2116-24.
  35. Miyamoto K-I, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 2005;9(4):331-5.
  36. Kuro-o M. Klotho. *Pflug Arch Eur J Phy* 2010;459(2):333-43.
  37. Liu S. Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006;17(5):1305-15.
  38. John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in Aging, Phosphate Metabolism, and CKD. *YAJKD* 2011;1-8.
  39. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almaden Y, et al. Direct and indirect effects of

- parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney International* 2011;79(7):742-8.
40. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Jüppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney International* 2003;64(6):2272-9.
  41. Gutierrez O. Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005;16(7):2205-15.
  42. Marsell R, Grundberg E, Krajsnik T, et al. Fibroblast growth factor-23 is associated with parathyroid hormone and renal function in a population-based cohort of elderly men. *European Journal of Endocrinology* 2008;158(1):125-9.
  43. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007;18(9):2600-8.
  44. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, et al. FGF-23 Associates with Death, Cardiovascular Events, and Initiation of Chronic Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011;22(10):1913-22.
  45. Isakova T, Wolf MS. FGF23 or PTH: which comes first in CKD? *Kidney International* 2010;78(10):947-9.
  46. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International* 2011:1-9.
  47. 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. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010;25(12):3983-9.
  48. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and



- mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008;359(6):584-92.
49. Isakova T, Xie H, Yang W, et al. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2011;305(23):2432-9.
  50. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;242(3):626-30.
  51. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* 1998;424(1-2):6-10.
  52. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390(6655):45-51.
  53. Mian IS. Sequence, structural, functional, and phylogenetic analyses of three glycosidase families. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24(2):83-100.
  54. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007;117(12):4003-8.
  55. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2006;15(4):437-41.
  56. Kurosu H. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. *J Biol Chem* 2006;281(10):6120-3.
  57. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444(7120):770-4.
  58. Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB, White KE. Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations. *Bone* 2005;36(6):971-7.

59. Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(50):19796-801.
60. Imura A, Iwano A, Tohyama O, et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565:143-7.
61. Kurosu H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* 2005;309(5742):1829-33.
62. Cha S-K, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-o M, Huang C-L. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(28):9805-10.
63. Chang Q. The  $\beta$ -Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel. *Science* 2005;310(5747):490-3.
64. Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005;85(1):373-422.
65. Tsuruoka S, Nishiki K, Ioka T, et al. Defect in parathyroid-hormone-induced luminal calcium absorption in connecting tubules of Klotho mice. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(10):2762-7.
66. Cha S-K, Hu M-C, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang C-L. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol* 2009;76(1):38-46.
67. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB Journal* 2010;24(9):3438-50.
68. Komaba H, Goto S, Fujii H, et al. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney International* 2009:1-7.
69. 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 International* 2009;77(3):211-8.
70. Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, et al. Involvement of Alpha-Klotho and Fibroblast Growth Factor Receptor in the Development of Secondary Hyperparathyroidism. *Am J Nephrol* 2010;31(3):230-8.
  71. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MAI, et al. Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney International* 2010;78(10):1024-32.
  72. Koh N. Severely Reduced Production of Klotho in Human Chronic Renal Failure Kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;280(4):1015-20.
  73. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011;22(1):124-36.
  74. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(7):2331-6.
  75. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2005;20(12):2636-45.
  76. Hu M-C, Shi M, Zhang J, Quinones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney International* 2010;78(12):1240-51.
  77. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;398(3):513-8.
  78. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

79. Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* 2003;139(2):137-47.
80. Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clinical Chemistry* 2007;53(4):766-72.
81. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, et al. Instability of fibroblast growth factor-23 (FGF-23): Implications for clinical studies. *Clinica Chimica Acta* 2011:1-4.
82. ROSE GA. The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bull World Health Organ* 1962;27:645-58.
83. Bruning JL, Kintz BL. *Computation book of statistics.* 1997.
84. Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, et al. Serum levels of soluble secreted  $\alpha$ -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clin Exp Nephrol* 2012;
85. Kuro-o M. Phosphate and Klotho. *Kidney International* 2011;79(S121):S20-3.
86. Sugiura H, Tsuchiya K, Nitta K. Circulating levels of soluble  $\alpha$ -Klotho in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2011;15(5):795-6.
87. Devaraj S, Syed B, Chien A, Jialal I. Validation of an Immunoassay for Soluble Klotho Protein: Decreased Levels in Diabetes and Increased Levels in Chronic Kidney Disease. *Am J Clin Pathol* 2012;137(3):479-85.
88. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, et al. Soluble Klotho and Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012;7(2):248-57.
89. Akimoto T, Shiizaki K, Sugase T, et al. The relationship between the soluble Klotho protein and the residual renal function among peritoneal dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2012:1-6.
90. Semba RD, Cappola AR, Sun K, et al. Relationship of low plasma klotho with poor grip strength in older community-dwelling adults: the InCHIANTI study.

- Eur J Appl Physiol 2012;112(4):1215-20.
91. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. J Bone Miner Res 2011;26(11):2672-81.
  92. Kuro-o M. Klotho in health and disease. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2012;21(4):362-8.
  93. Titan SM, Zatz R, Gracioli FG, et al. FGF-23 as a Predictor of Renal Outcome in Diabetic Nephropathy. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2011;6(2):241-7.
  94. Semba RD, Cappola AR, Sun K, et al. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2011;66(7):794-800.
  95. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, et al. Fibroblast Growth Factor-23 and Death, Heart Failure, and Cardiovascular Events in Community-Living Individuals. JAC 2012:1-8.
  96. Jean G, Terrat JC, Vanel T, et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. Nephrology Dialysis Transplantation 2009;24(9):2792-6.
  97. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, et al. The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. Ann Intern Med 2010;152(10):640-8.
  98. Udell JA, O'Donnell T, Morrow D. Association of fibroblast growth factor (FGF)-23 levels with risk of cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology 2012;59:E1480-0.
  99. 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):956-62.

100. 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. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010;25(12):3983-9.
101. Nakano C, Hamano T, Fujii N, et al. Intact fibroblast growth factor 23 levels predict incident cardiovascular event before but not after the start of dialysis. *Bone* 2012;50(6):1266-74.
102. Semba RD, Fink JC, Sun K, et al. Serum Fibroblast Growth Factor-23 and Risk of Incident Chronic Kidney Disease in Older Community-Dwelling Women. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012;7(1):85-91.
103. Nitta K. Relationship between Fibroblast Growth Factor-23 and Mineral Metabolism in Chronic Kidney Disease. *International Journal of Nephrology* 2010;2010:1-7.
104. Larsson TE. The role of FGF-23 in CKD-MBD and cardiovascular disease: friend or foe? *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010;25(5):1376-81.
105. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C-Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351(13):1296-305.
106. Schmitt CP, Odenwald T, Ritz E. Calcium, calcium regulatory hormones, and calcimimetics: impact on cardiovascular mortality. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(4 Suppl 2):S78-80.
107. Block GA. Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004;15(8):2208-18.
108. Linefsky JP, O'Brien KD, Katz R, et al. Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;58(3):291-7.
109. Anavekar NS, Pfeffer MA. Cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Kidney International* 2004;66(s92):S11-5.

110. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998;31(4):607-17.
111. 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):2131-8.
112. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G, Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 2005;112(17):2627-33.
113. Heine GH, Seiler S, Fliser D. FGF-23: the rise of a novel cardiovascular risk marker in CKD. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27(8):3072-81.
114. Isakova T, Anderson CAM, Leonard MB, et al. Diuretics, calciuria and secondary hyperparathyroidism in the Chronic Renal Insufficiency Cohort. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011;26(4):1258-65.
115. Jüppner H. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl* 2011;(121):S24-7.
116. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27(7):2650-7.
117. Nagano N, Miyata S, Abe M, et al. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. *Kidney International* 2006;69(3):531-7.
118. Pande S, Ritter CS, Rothstein M, et al. FGF-23 and sFRP-4 in Chronic Kidney Disease and Post-Renal Transplantation. *Nephron Physiol* 2006;104(1):p23-p32.
119. Koiwa F, Kazama JJ, Tokumoto A, et al. Sevelamer hydrochloride and calcium bicarbonate reduce serum fibroblast growth factor 23 levels in dialysis patients. *Ther Apher Dial* 2005;9(4):336-9.
120. Shigematsu T, Negi S, the COLC Research Group. Combined therapy with

lanthanum carbonate and calcium carbonate for hyperphosphatemia decreases serum FGF-23 level independently of calcium and PTH (COLC Study). *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27(3):1050-4.

121. Shimada T, Fukumoto S. FGF23 as a novel therapeutic target. *Adv Exp Med Biol* 2012;728:158-70.
122. Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J Clin Invest.* 2012 Jul 2;122(7):2543-53. doi: 10.1172/JCI61405.
123. Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, et al. Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res* 2008;23(9):1509-18.
124. Aono Y, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. Anti-FGF-23 neutralizing antibodies ameliorate muscle weakness and decreased spontaneous movement of Hyp mice. *J Bone Miner Res* 2011;26(4):803-10.



# 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung chronische Nierenerkrankung .....	14
Tabelle 2: Parameter Blutwerte .....	16
Tabelle 3: Spontan- und Sammelurin-Untersuchungsparameter.....	17
Tabelle 4: Baseline Charakteristika der Patienten - unterteilt nach K/DOQI Stadien 2-4 .....	23
Tabelle 5: Baseline Charakteristika der Patienten - unterteilt nach sKlotho Plasmaspiegeln .....	26
Tabelle 6: Koeffizienten der Spearman Korrelation von Parametern des Calcium-Phosphat-Metabolismus und sKlotho.....	28
Tabelle 7: Mittelwerte bzw. Median von Markern des Ca-Pi-Stoffwechsels, stratifiziert nach Ereignissen .....	31
Tabelle 8: Vorliegen klassischer Risikofaktoren der CKD, stratifiziert nach Ereignissen .....	32
Tabelle 9: Univariates und multivariates Cox Regressionsmodell (kombinierter Endpunkt ist Halbierung der eGFR, Initiation Nierenersatztherapie oder Tod) .....	37
Tabelle 10: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß Wirkstoffklasse der Diuretika.....	39
Tabelle 11: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß CKD-Stadium und gemäß Einnahme von Schleifendiuretika .....	40
Tabelle 12: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der Gesamtkohorte gemäß CKD-Stadium und gemäß Einnahme von Thiaziddiuretika .	41

Tabelle 13: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der CKD Patienten mit erhaltener systolischer LV Funktion gemäß Einnahme von Schleifendiuretika .....	42
Tabelle 14: Parameter des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels nach Aufteilung der CKD Patienten mit erhaltener systolischer LV Funktion gemäß Einnahme von Thiaziddiuretika .....	43
Tabelle 15: Querschnittsuntersuchungen zur Assoziation von sKlotho und Nierenfunktion .....	49
Tabelle 16: Prospektive Kohortenstudien zur prognostischen Bedeutung von FGF-23 bei CKD Patienten .....	54
Tabelle 17: Prospektive Kohortenstudien zur prognostischen Bedeutung von FGF-23 in nicht-CKD Kollektiven .....	56

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spearman-Korrelation Serum-Pi und eGFR.....	25
Abbildung 2: Parameter des Ca-Pi-Metabolismus, stratifiziert nach K/DOQI.....	29
Abbildung 3: sKlotho und ereignisfreies Überleben.....	33
Abbildung 5: Parathormon Spiegel und ereignisfreies Überleben .....	35
Abbildung 6: Fraktionelle Phosphatausscheidung und ereignisfreies Überleben .....	36

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ABI	Ankle Brachial Index (Knöchelarmindex)
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANOVA	Analysis Of Variance
ANP	Artrial Natriuretic Peptide
ARB	Angiotensin Receptor Blocker
ArMORR	Accelerated Mortality on Renal Replacement
AS	Aminosäure
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
Apo A	Apolipoprotein A
Apo B	Apolipoprotein B
B	Regressionskoeffizient
BB	Betablocker
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Ca-P <sub>i</sub> -Metabolismus	Calcium-Phosphat-Metabolismus
CHS	Cardiovascular Health Study
CRP	C-Reaktives Protein
CSS	Cross Sectional Study
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders
CVD	Cardiovascular Disease
D	Dialyse
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFR	Geschätzte (estimated) glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Essay
ESRD	End Stage Renal Disease
FeCa	Fractional excretion of Calcium
FePi	Fractional excretion of Phosphate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor

HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPFS	Health Professional Follow-Up Study
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
K/DOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
LDL	Low Density Lipoprotein
LVF	Linksventrikuläre Funktion
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
Na/P <sub>i</sub>	Natrium/Phosphat
NKF	National Kidney Foundation
NT-pro-BNP	N-terminal prohormone of Brain Natriuretic Peptide
p	p-Wert
PEACE	Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition
PD	Peritonealdialyse
POCS	Prospective Observational Cohort Study
PTH	Parathormon
r	Pearson Korrelationskoeffizient
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
RRF	Residual Renal Function
RRT	Renal Replacement Therapy
SD	Schleifendiuretikum
SE	Standardfehler
SEM	Standard Error of the Mean
SSPS	Statistical Product Service Solutions
TD	Thiaziddiuretikum
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-Alpha
TRPV	Transient Receptor Potential
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
WHR	Waist-to-Hip-Ratio
WHAS	Women's Health And Aging Study
XLH	X-linked Hypophosphataemia

## 10. Publikationen

Die zentralen Ergebnisse der vorgelegten Dissertationsschrift wurden 2012 in der Zeitschrift *Kidney International* veröffentlicht:

<sup>1</sup>.

Weitere Teilergebnisse wurden 2011 in der Zeitschrift *European Heart Journal* publiziert:

<sup>2</sup>.

# 11. Kongressvorstellungen

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 56. Jahres-Kongress der Saarländisch-Pfälzischen Internisten Gesellschaft (SPIG), 01. - 03. März 2012, Neustadt an der Weinstraße.
- 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 14. - 17. April 2012, Wiesbaden.
- 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 06. - 09. Oktober 2012, Hamburg.

## *12. Danksagung*

Besonderen Dank gelten meiner Betreuerin Frau Dr. Sarah Seiler sowie meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Gunnar H. Heine für die außerordentlich gute Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit und dafür stets Geduld und ein offenes Ohr für meine Fragen zu haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Danilo Fliser für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikum des Saarlandes.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Martina Wagner, Adam Zawada und dem gesamten Ambulanzteam der Nephrologie sowie insbesondere bei Marie Blinn für die besonders gute Zusammenarbeit.

Ich danke Frau Dr. Jurecka, Frau Dr. Marell, Frau Dr. Michaeli und Herrn Dr. Rogacev für die gelungene Absprache bei der klinischen Datenerhebung.

Herzlichen Dank an alle teilnehmenden Patienten der CARE FOR HOME Studie für ihre investierte Zeit und Geduld.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Korrekturlesern sowie Allen, die in jedweder Form am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Abschließend ist mir ein anerkennendes, von Herzen kommendes Dankeschön besonders wichtig: Ich danke meiner Familie für ihre allgegenwärtige Unterstützung - bei allem was ich tue. Diese Arbeit ist Euch gewidmet. Danke.