

**Untersuchung des Sekundären
Hyperparathyreoidismus in einem Mausmodell der
chronisch progredienten Niereninsuffizienz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bohnert, Bernhard Nikolaus

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Billing

3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Schlieper

„Sicher ist, dass nichts sicher ist. Selbst das nicht.“

(Joachim Ringelnatz)

Meiner Familie

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Die Niere - Schnittstelle zwischen Nephrologie und Endokrinologie .	1
1.1.1	Die Physiologie des Calcium-Phosphat-Haushaltes.....	1
1.2	Die Niereninsuffizienz	5
1.3	Der Sekundäre Hyperparathyreoidismus	7
1.3.1	Klassische Sichtweise des SHPT	8
1.3.2	Neue Aspekte des SHPT.....	9
1.3.3	Aktuelle Sicht der Pathophysiologie	12
1.3.4	Therapien	13
1.4	Ziel der Arbeit.....	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Mausmodell	20
2.2.2	Studiendesign.....	20
2.2.3	Blut- und Urin-Parameter.....	23
2.2.4	Gewebeanalysen.....	34
3.	Ergebnisse	41
3.1	Entwicklung und Verlauf des SHPT	41
3.1.1	Induktion des Modells und Klinischer Verlauf	41
3.1.2	Nierenfunktion	44
3.1.3	Endokrinologischer Verlauf.....	46

3.1.4	Weitere Parameter	48
3.1.5	Gewebeanalytik	50
3.1.6	Korrelationen	51
3.1.7	Zusammenfassung – Entwicklung und Verlauf des SHPT	53
3.2	Therapie des SHPT	54
3.2.1	Nierenfunktion	54
3.2.2	Endokrinologische Therapieauswirkungen	56
3.2.3	Gewebeanalytik	59
3.2.4	Interventionelle Therapie und Überlebensanalyse	63
3.2.5	Zusammenfassung - Therapie des SHPT	66
4.	Diskussion.....	67
4.1	Entwicklung und Verlauf des SHPT	67
4.2	Therapie des SHPT.....	72
4.3	Ausblick.....	76
4.4	Zusammenfassung.....	77
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literaturverzeichnis.....	79
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	88
8.	Veröffentlichungen	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Der Calcium-Phosphat-Stoffwechsel [1].....	5
Abb. 1.2:	CKD Stadieneinteilung [2]	6
Abb. 1.3:	Prognose der einzelnen CKD Stadien [2].....	7
Abb. 1.4:	Klassische Sichtweise des SHPT [6].....	8
Abb. 1.5:	Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling [3].....	10
Abb. 1.6:	Neuere Sichtweise des SHPT [6]	13
Abb. 2.1:	Studiendesign: Verlauf des SHPT	21
Abb. 2.2:	Studiendesign: Therapieversuche	22
Abb. 2.3:	Studiendesign: Interventionelle Therapie und Überlebensanalyse	22
Abb. 2.4:	Funktionsprinzip Sandwich-ELISA	28
Abb. 2.5:	Funktionsprinzip kompetitiver EIA	29
Abb. 2.6:	Prinzip der RTQ-PCR am Beispiel GAPDH.....	35
Abb. 2.7:	Schmelzkurvenanalyse am Beispiel GAPDH	36
Abb. 3.1:	Induktionsdosis.....	41
Abb. 3.2:	Gewichtsverlauf nach Induktion	42
Abb. 3.3:	Klinischer Verlauf	43
Abb. 3.4:	Nierenfunktionsparameter im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100]	44
Abb. 3.5:	Endokrinologische Parameter im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100]	46
Abb. 3.6:	Verlauf weiterer Parameter, publiziert in [100]	48
Abb. 3.7:	Genexpression im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100].....	50
Abb. 3.8:	Vergleich der Nierenfunktion nach 30 Tagen unter verschiedenen Therapieansätzen, publiziert in [100]	54
Abb. 3.9:	Endokrinologische Wirkung der verschiedenen Therapien nach 30 Tagen, publiziert in [100].....	56

Abb. 3.10:	Veränderung der Genexpression unter Therapie nach 30 Tagen, publiziert in [100]	59
Abb. 3.11:	Exemplarische Nierenschnitte nach 30 Tagen Verlauf, publiziert in [100]	61
Abb. 3.12:	Glomerulärer und tubulärer Nierenschaden, publiziert in [100]	62
Abb. 3.13:	Interventionelle Therapie mit Phosphatrestriktion, publiziert in [100]	64
Abb. 3.14:	Kaplan-Meier-Kurve über 103 Tage nach Induktion	65
Abb. 4.1:	Abfolge pathophysiologischer Ereignisse in der Entstehung eines SHPT bei Doxorubicin-induzierter Nephropathie, publiziert in [100]	77
Abb. 8.1:	Nierenschnitte nach 30 Tagen Verlauf, publiziert in [100]	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte	16
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 3:	Verwendete Kits und Reagenzien	17
Tabelle 4:	Eingesetzte Medikamente	18
Tabelle 5:	Verwendete Primer	19
Tabelle 6:	In der Tierhaltung verwendete Produkte	19
Tabelle 7:	Tierverbrauch und Sterblichkeit, publiziert in [100]	93
Tabelle 8:	Proteinbestimmung Pyrogallolrot Methode: Standardkurve	94
Tabelle 9:	Korrelationen	95

Abkürzungsverzeichnis

... < kleiner als ...
... > größer als ...
1,25OH Vit. D	1,25-Dihydroxycholecalciferol , Calcitriol
25OH Vit. D	25-Hydroxycholecalciferol , Calcidiol
Abb.	Abbildung
AKI	acute kidney injury (akutes Nierenversagen)
anti-GBM	anti-glomerular basement membrane (Glomeruläre Basalmembran)
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin Triphosphat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
c[...]	Konzentration [von ...]
CaR	calcium sensing receptor
CKD	chronic kidney disease (chronische Niereninsuffizienz)
CKD-MBD	chronic kidney disease – mineral and bone disorder (chronische Niereninsuffizienz – Mineral- und Knochenstoffwechselstörung)
CYP24A1	Cytochrom P 450 24A1 (24-Hydroxylase)
CYP27B1	Cytochrom P 450 27B1 (1 α -Hydroxylase)
d-	Dezi- (10 ⁻¹)
Da	Dalton
DBP	vitamin D binding protein (Vitamin D bindendes Protein)
DNA	Desoxyribonucleinacid
FGF23	fibroblast growth factor 23
FGFR	fibroblast growth factor receptor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde(n)
k-	kilo- (10 ³)
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes; <i>gemeinnützige Organisation zur weltweiten Verbesserung der Behandlung von Nierenkrankheiten</i>
KG (BW)	Körpergewicht (body weight)

l	Liter
μ-	Mikro- (10^{-6})
M	Molar (mol/l)
m-	Milli- (10^{-3})
-m	Meter
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute(n)
(m)RNA	(messenger) Ribonucleinacid
n-	Nano- (10^{-9})
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid mit Hydridion
NaP _i	Natrium-Phosphat Kotransporter
p-	Piko- (10^{-12})
PBS	phosphate buffered saline
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PTH	Parathormon
PTHr1	PTH/PTHrP-Rezeptor
PTHrP	PTH related Peptide
rpm	rounds per minute
RTQ-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
s	Sekunde(n)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SHPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TRPV5	transient receptor potential channel, subfamily V, member 5
TRPV6	transient receptor potential channel, subfamily V, member 6
v.a.	vor allem
VDP	Vitamin D bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	vitamin D response element
vs	versus
Wnt	wingless-related integration site
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die Niere - Schnittstelle zwischen Nephrologie und Endokrinologie

Die Niere ist ein zentrales Organ des menschlichen Organismus. Neben ihrer zentralen Ausscheidungsfunktion kommt ihr bei der Regulation der Homöostase des Organismus eine wichtige Rolle zu. Ebenso nimmt sie verschiedenste Aufgaben im Metabolismus von Proteinen, Peptidhormonen und Medikamenten sowie bei der Gluconeogenese wahr.

Darüber hinaus ist die Niere ein endokrin aktives Organ. Calcitriol und Erythropoietin werden hier gebildet. Über das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem werden der Natrium-Bestand und der Blutdruck reguliert. Ebenso haben zahlreiche Hormone an der Niere ihren Wirkort. Als Beispiele sollen hier das Antidiuretische Hormon (ADH), Aldosteron, Calcitriol und Parathormon (PTH) genannt werden [7].

1.1.1 Die Physiologie des Calcium-Phosphat-Haushaltes

Grundlegend für das Verständnis des sekundären Hyperparathyreoidismus (SHPT) ist die Physiologie des Calcium-Phosphat-Haushaltes. Hier nimmt die Niere als Ausscheidungsorgan und endokrin aktives Organ eine zentrale Rolle ein.

In der Regulation des Calcium-Phosphat-Haushaltes gibt es drei wesentliche Hormone, die über den Darm, den Knochen und die Niere für eine Homöostase von Calcium und Phosphat sorgen.

1.1.1.1 Parathormon (PTH)

PTH ist ein zentrales Hormon des Calcium-Phosphat-Haushaltes. Das aus 84 Aminosäuren bestehende Peptidhormon wird in den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen gebildet [7, 8].

Die Regulation der Sekretion erfolgt zum einen über die extrazelluläre Calcium-Konzentration [9], wodurch es zu einer Aktivierung des membranständigen *Calcium sensing receptor* (CaR) kommt. Dieser wirkt über G-Protein gekoppeltes Signaling sowie über Veränderungen am Zytoskelett einer Sekretion von PTH entgegen [10-13]. Zum anderen wird die PTH-Sekretion über die extrazelluläre Phosphatkonzentration stimuliert. Phosphat wirkt vermutlich über eine Stabilisierung der PTH-mRNA sowie über eine Verringerung des Calciumspiegels [14].

PTH wirkt, zusammen mit dem verwandten PTH-related peptide (PTHrP), über den G-Protein gekoppelten PTH/PTHrP- Rezeptor (PTHR1). Dieser wiederum wirkt sowohl über Protein Kinase A (PKA)- wie auch über PKC gekoppelte G-Proteine und über den mitogen-activated protein Kinase (MAPK) Signalweg [12].

Unter kontinuierlichem PTH-Einfluss kommt es durch eine indirekte Aktivierung von Osteoklasten durch Osteoblasten zu einer Mobilisation von Calcium und Phosphat aus dem Hydroxylapatit des Knochens. Intermittierende PTH-Stimulation fördert hingegen die Knochenbildung durch eine alleinige Stimulation der Osteoblasten [15].

Renal wird im proximalen Tubulus die Resorption von Phosphat gehemmt. Unter PTH kommt es hier über den an der apikalen und basolateralen Membran des proximalen Tubulus exprimierten PTHR1 zu einer Internalisierung der Natrium-Phosphat-Kotransporter $\text{NaP}_i\text{-IIa}$ und $\text{NaP}_i\text{-IIc}$ [16]. Ebenfalls im proximalen Tubulus kommt es durch PTH zu einer Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers und der Natrium-Kalium-ATPase, was zu einem Bicarbonat Verlust führt [17]. Darüber hinaus führt

PTH zu einem Chlorid-Ausstrom und einer Hyperpolarisation im distalen Tubulus, was eine vermehrte Calcium-Resorption über spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle verursacht [18].

Insgesamt kommt es durch PTH zu einem Anstieg des Serum-Calciums und zu einem Abfall des Serum-Phosphates [8].

1.1.1.2 Calcitriol

Durch Ultraviolettstrahlung wird in der Haut aus dem Provitamin 7-Dehydrocholesterin Cholecalciferol (Vitamin D₃ / Calcidiol) gebildet. Durch Hydroxylierung entsteht hieraus in der Leber zunächst Calcidiol (25-OH-Vitamin D₃) [7, 8].

Mit Hilfe des Enzyms 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) entsteht aus dem Calcidiol im proximalen Tubulus der Niere das wirksame Hormon Calcitriol (1,25-(OH)₂-Vitamin D₃). Die renale 1 α -Hydroxylase wird durch PTH, Hypocalciämie und Hypophosphatämie induziert [19] und durch eine Hypercalciämie sowie eine Hyperphosphatämie supprimiert [20]. Neben der 1 α -Hydroxylase dienen Calcidiol und Calcitriol auch als Substrate für die 24-Hydroxylase (CYP24A1). Diese inaktiviert durch Hydroxylierung ihre Substrate. Die 24-Hydroxylase wird durch Calcitriol stimuliert und durch Hypocalciämie sowie PTH supprimiert [20].

Bei den Vitamin D-Metaboliten handelt es sich um lipophile Moleküle mit nur geringer Wasserlöslichkeit, weshalb sie im Plasma nur proteingebunden transportiert werden können. Das wichtigste Bindeprotein ist das Vitamin D-bindende-Protein (DBP). Dieses bindet folgende Metabolite mit abnehmender Affinität: Calcidiol, 24,25-Dihydroxy-Vitamin D, Calcitriol und Vitamin D. Kleinere Mengen sind an Albumin oder Lipoproteine gebunden. Biologische Aktivität zeigt nur der freie, ungebundene Teil an Calcitriol. An DBP gebundenes Calcidiol wird in der Niere filtriert und von den Zellen des proximalen Tubulus über Megalin vermittelte Endocytose resorbiert. Hier findet im Anschluss dann die Hydroxylierung zu Calcitriol statt [21].

Die Wirkung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D auf den Calcium- und Phosphathaushalt werden über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) moduliert [22-25]. Calcitriol bildet zusammen mit dem VDR einen Komplex, der im Zellkern hormonsensitive Nukleotidsequenzen, sogenannte *vitamin D response elements* (VDRE), aktiviert, welche dann als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren dienen [19].

In den Enterozyten kommt es durch Calcitriol zu einer gesteigerten Expression von *transient receptor potential channel, subfamily V, member 6* (TRPV6) und der membranständigen Calcium-ATPase (PMCA). Dies führt zur Calciumresorption [19]. Ebenso wird die Phosphatresorption gesteigert. Dies geschieht möglicherweise über Hochregulation von Natrium-Phosphat Kotransporter NaP_i-III (Pit-2) [26]. Eine Resorption über NaP_i-IIb scheint Vitamin D unabhängig geregelt zu sein [27].

In Osteoblasten wird der VDR ebenfalls exprimiert. Bei der Knochenbildung spielt aber die Bereitstellung von Calcium und Phosphat über die durch Calcitriol gesteigerte intestinale Resorption wahrscheinlich eine übergeordnete Rolle [28].

In der Nebenschilddrüse erhöht Calcitriol die CaR-Expression, was die Nebenschilddrüse gegenüber zirkulierendem Calcium sensibilisiert und somit die PTH-Synthese indirekt inhibiert [29]. Darüber hinaus inhibiert Calcitriol die PTH-Synthese und Freisetzung direkt [30].

Im distalen Tubulus der Niere führt Calcitriol zu einer gesteigerten Expression des intrazellulären Calbindin D28k, des *transient receptor potential channel, subfamily V, member 5* (TRPV5) der apikalen Membran sowie des ATP-abhängigen Calcium-Transporters der basolateralen Membran. Somit wird die PTH abhängige Calciumresorption unterstützt [31]. Calcitriol bewirkt im Endeffekt ein Anstieg des Serum-Calciums und des Serum-Phosphates [8].

1.1.1.3 Calcitonin

Als drittes wesentliches Hormon im Calcium-Phosphat-Haushalt soll nun der Vollständigkeit halber noch Calcitonin genannt werden, das im Hinblick auf den SHPT allerdings eine untergeordnete Rolle spielt.

Das Peptidhormon Calcitonin wird vorwiegend in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet.

Erhöhte Calcium-Spiegel im Plasma führen zu einer Calcitonausschüttung, was zu einer vermehrten Einlagerung von Calcium im Knochen führt.

Renal führt Calcitonin, wie auch PTH, zu einer vermehrten Ausscheidung von Phosphat und einer vermehrten Resorption von Calcium [7].

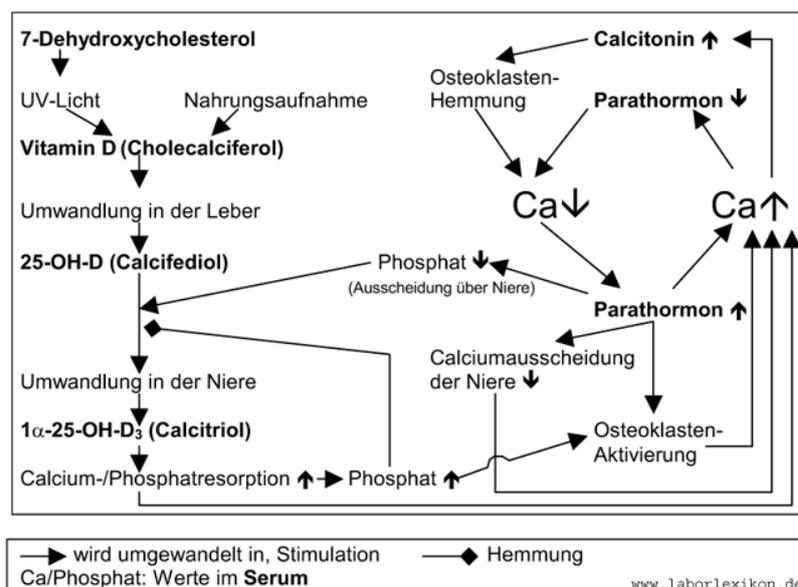


Abb. 1.1: Der Calcium-Phosphat-Stoffwechsel [1]

1.2 Die Niereninsuffizienz

Infolge einer irreversiblen Verminderung der Nephronenzahl kommt es zur Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD). Hierfür können unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein. Bei Menschen ist die diabetische Nephropathie mit ca. 35% die mit Abstand häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz, aber auch Glomerulonephritiden können ursächlich für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz sein [32].

Als Beispiel einer solchen Glomerulopathie soll hier die sogenannte fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) genannt werden. Aufgrund der Schädigung und des Verlustes von Podozyten kommt es hier zu einer Unterbrechung der Filtrationsmembran und in Folge dessen zu Adhäsionen zwischen den glomerulären Kapillarschlingen und der Bowman-Kapsel. Klinisch führt diese glomeruläre Schädigung zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms mit starker Proteinurie, Hypoproteinämie, Ödemen und Hyperlipoproteinämie und letztlich in chronischer Form zum Verlust des betreffenden Glomerulus und zu einer terminalen Niereninsuffizienz [32].

Als Folge einer chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu einem Versagen der exkretorischen Nierenfunktion, zu Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, zur Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion sowie sekundär zu Organschädigungen durch die retinierten harnpflichtigen Substanzen [32].

Die chronische Niereninsuffizienz wird, den KDIGO-Leitlinien 2012 folgend, anhand der GFR in fünf Stadien eingeteilt. Darüber hinaus lässt eine zusätzliche Berücksichtigung der Albuminurie eine Einschätzung der Prognose und des Risikos der Entwicklung einer CKD zu [2].

1.2: STAGING OF CKD

1.2.1: We recommend that CKD is classified based on cause, GFR category, and albuminuria category (CGA). (1B)

1.2.2: Assign cause of CKD based on presence or absence of systemic disease and the location within the kidney of observed or presumed pathologic-anatomic findings. (Not Graded)

1.2.3: Assign GFR categories as follows (Not Graded):

GFR categories in CKD		
GFR category	GFR (ml/min/1.73 m ²)	Terms
G1	≥ 90	Normal or high
G2	60-89	Mildly decreased*
G3a	45-59	Mildly to moderately decreased
G3b	30-44	Moderately to severely decreased
G4	15-29	Severely decreased
G5	< 15	Kidney failure

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; GFR, glomerular filtration rate.

*Relative to young adult level

In the absence of evidence of kidney damage, neither GFR category G1 nor G2 fulfill the criteria for CKD.

1.2.4: Assign albuminuria* categories as follows (Not Graded):

*note that where albuminuria measurement is not available, urine reagent strip results can be substituted (Table 7)

Category	AER (mg/24 hours)	ACR (approximate equivalent)		Terms
		(mg/mmol)	(mg/g)	
A1	< 30	< 3	< 30	Normal to mildly increased
A2	30-300	3-30	30-300	Moderately increased*
A3	> 300	> 30	> 300	Severely increased**

Abb. 1.2: CKD Stadieneinteilung [2]

Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz anhand der GFR in fünf Stadien (G1-G5) und Anhand der Albuminurie in drei Stadien (A1-A3).

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012

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

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Abb. 1.3: Prognose der einzelnen CKD Stadien [2]

1.3 Der Sekundäre Hyperparathyreoidismus

Eine der typischen Folgeerkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz ist die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus (SHPT). Bereits im CKD-Stadium G3b (GFR 30-44 ml/min) tritt bei etwa 30% der Patienten ein SHPT auf. Im CKD-Stadium G5 (GFR <15 ml/min) liegt der Anteil der Patienten mit einem SHPT bei über 95% [32].

Der SHPT ist Teil eines Syndroms, welches in Folge einer chronischen Niereninsuffizienz sekundär entsteht und unter dem englischen Begriff *Chronic kidney disease - mineral and bone disorder* (CKD-MBD) zusammengefasst wird. Hierbei kommt es zu Störungen im Calcium-Phosphat-Haushalt und in der Folge im Knochenstoffwechsel.

Die als ursächlich für die Entwicklung des SHPT angesehenen pathophysiologischen Faktoren unterliegen aktuell einem Wandel und somit auch die Frage nach einer effizienten Therapie des SHPT.

1.3.1 Klassische Sichtweise des SHPT

Als wichtige Faktoren für die Entwicklung eines renalen SHPT werden klassisch eine Hypocalciämie, eine Verminderung der Calcidiol- und Calcitriol-Spiegel, eine Skelettresistenz gegenüber der kalziämischen Wirkung von PTH sowie eine im fortgeschrittenen Stadium der Niereninsuffizienz auftretende Phosphatretention angesehen.

Als pathophysiologisch ursächlich für die gesteigerte PTH-Sekretion gelten eine gestörte gastrointestinale Calciumabsorption, eine Abnahme des supprimierenden Effekts von Calcitriol auf die Biosynthese und Sekretion von PTH sowie eine direkte Stimulation der PTH-Sekretion durch die Hyperphosphatämie [32].

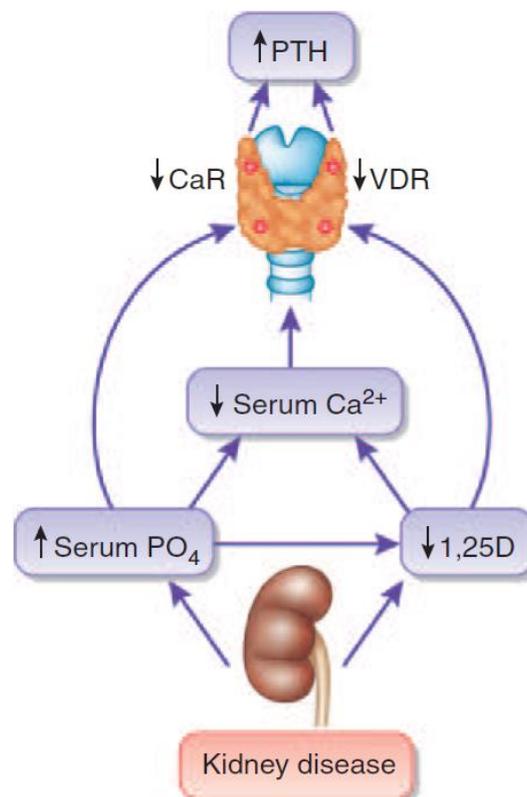


Abb. 1.4: Klassische Sichtweise des SHPT [6]

1.3.2 Neue Aspekte des SHPT

Im Gegensatz zur Regulation der Calcium-Homöostase war bisher relativ wenig über die Regulation der Phosphat-Homöostase bekannt. Mit der Entdeckung des *fibroblast growth factor 23* (FGF23) im Jahr 2000 [33] und seiner Identifikation als Phosphat ausscheidendes Hormon, einem sogenannten Phosphatonin [34], rückten bei der Betrachtung des SHPT eine bisher unerkannte Hormonachse zwischen Knochen, Nebenschilddrüse und Niere und die dadurch gesteuerte Phosphat-Homöostase ins Blickfeld [6, 8, 35, 36].

1.3.2.1 Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23)

Bei FGF23 handelt es sich um ein 251 Aminosäuren umfassendes Glycoprotein mit einer Molekülmasse von 32 kDa. Gebildet wird FGF23 vor allem von Osteoblasten und Osteoklasten im Knochen. Kleinere Mengen von FGF23 wurden aber auch in ventrolateralen Thalamuskernen, im Thymus, im Dünndarm sowie im Herzen nachgewiesen [33, 35, 37].

Die Synthese von FGF23 wird durch PTH, Phosphat, Calcium und Calcitriol stimuliert. Phosphat und Calcium führen wahrscheinlich über eine Veränderung des Knochenstoffwechsels mit Freisetzung von niedermolekularen Fibroblast growth factors (LMW FGFs) aus der Knochenmatrix zu einer Aktivierung des FGF-Rezeptor 1 (FGFR1) und damit zu einer gesteigerten Transkription von FGF23 [38, 39]. Darüber hinaus wird diskutiert, ob anstelle des Serum Phosphat-Spiegels eher die Phosphat-Last des Körpers eine Rolle in der Regulation von FGF23 spielt [37]. PTH führt im Knochen über die PKA- und den Wnt-Signalweg zu einer erhöhten FGF23-Bildung [40]. Unabhängig von Phosphat und PTH trägt auch Calcitriol direkt über entsprechende VDREs und indirekt über Interleukin 6 (IL6) und Leptin zu einer gesteigerten FGF23-Synthese im Knochen bei [41, 42].

Gehemmt wird die Synthese von FGF23 durch Proteine der SIBLING (*small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*) -Familie, zu der Dentin Matrix

Protein 1 (DMP1), extrazelluläre Matrix-Phosphoglycoproteine (MEPE) und ASARM (*acidic serine aspartate rich MEPE-associated motif*)-Peptide gehören [37, 43, 44].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Hormonen der FGF-Familie, welche Zellfunktionen vorwiegend auf einem „lokalen“ Niveau regulieren, zeigt FGF23 eine renotrope wie auch eine parathyreotrope Wirkung. FGF23 wirkt hier über einen der vier FGF-Rezeptoren (FGFR 1-4). Durch alternatives Splicing entstehen bei FGFR 1-3 epithel- (FGFR1b-FGFR3b) und mesenchymspezifische (FGFR1c-FGFR3c) Rezeptorsubtypen. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors trägt eine Tyrosinkinase [45, 46]. Um den Rezeptor zu aktivieren, wird α -Klotho als Kofaktor benötigt. Dieses bindet FGF23 am C-Terminus und erhöht so die Affinität von FGF23 zum Rezeptor [47]. Aktivierte FGFRs bilden Heterodimere, die dann weiter über die MAPK-Kaskade auf die Genexpression einwirken [47, 48].

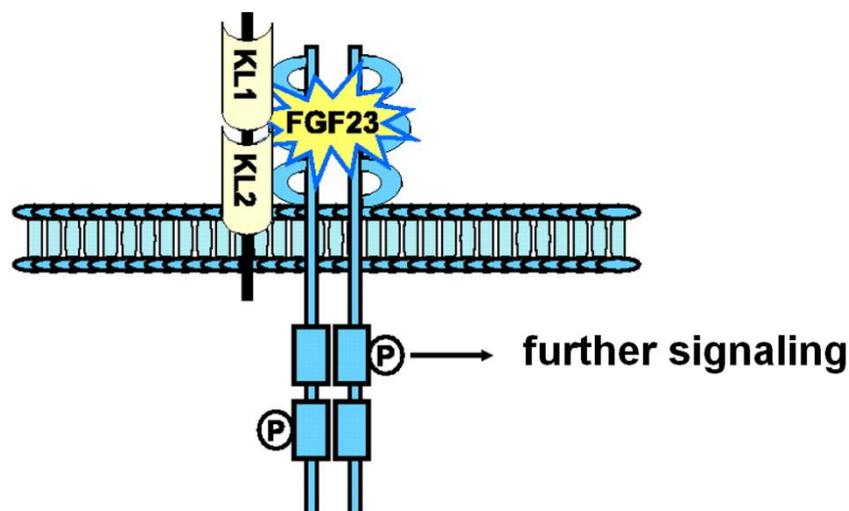


Abb. 1.5: Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling [3]

1.3.2.2 Klotho

Bei α -Klotho handelt es sich um ein Transmembranprotein, das 1997 in einer transgenen Mauslinie nachgewiesen wurde und durch Hyperphosphatämie, Hypercalciämie, erhöhte Vitamin D-Spiegel, beschleunigte Alterung sowie

eine verkürzte Lebensspanne auffiel [49]. Exprimiert wird es vor allem im distalen Tubulus der Niere [50, 51] und im Epithel des Plexus choroideus im Gehirn [50]. Auch in der Nebenschilddrüse und in anderen Organen wird α -Klotho exprimiert, allerdings in geringerem Ausmaß [37].

Neben dem membrangebundenen α -Klotho, wird dem gelösten s-Klotho ebenfalls eine Rolle als humoraler Faktor bzw. als Enzym zugeschrieben. s-Klotho entsteht entweder durch eine gesteigerte Transkription einer alternativ gespleißten Form des α -Klotho oder als Abscherung der extrazellulären Domäne von intaktem α -Klotho durch ADAM10 und ADAM17, Proteine der *A Disintegrin and Metalloproteinase domain containing protein* Familie [52].

Ein Zielorgan, in dem FGF23 seine Wirkung entfaltet, ist die Niere. Hier kommt es, wahrscheinlich vorwiegend FGFR3 und FGFR4 vermittelt, zu einer Reduktion der Calcitriol-Synthese im proximalen Tubulus [37, 53]. Dies wird zum einen über eine durch FGF23 stimulierte Expression von CYP24A1 erreicht, zum anderen geschieht dies über eine Reduktion der CYP27B1-Expression [54]. Wahrscheinlich vorwiegend FGFR1 vermittelt, kommt es ebenfalls in der Niere durch FGF23 zu einer verminderten Expression der Natrium-Phosphat-Kotransporter $\text{NaP}_i\text{-IIa}$ und $\text{NaP}_i\text{-IIc}$ [54, 55].

Aufgrund der vorwiegenden Expression der FGF-Rezeptoren sowie von α -Klotho im distalen Tubulus, stellt sich zwingend die Frage, wie über diese Rezeptoren eine Regulation des proximal-tubulären Phosphat- und Vitamin D-Metabolismus gelingt [50, 51, 56]. Eine Stimulation des proximalen Tubulus durch FGF23 erscheint daher nur über den Umweg einer Stimulation des distalen Tubulus durch FGF23 und einer dadurch bedingten parakrinen Stimulation des proximalen Tubulus möglich. Ein naheliegender parakriner Faktor hierfür wäre s-Klotho [37].

In der Nebenschilddrüse wurde gezeigt, dass FGF23 die Expression und Sekretion von PTH hemmt [57, 58]. Andererseits kommt es im Rahmen einer CKD mit erhöhtem FGF23 zu einem SHPT. Alles in allem scheinen FGF23

und PTH sich in einer Feedback-Schleife gegenseitig zu beeinflussen. Diese Interaktionen können aber durchaus durch andere systemische und lokale Faktoren beeinflusst werden [37].

FGF23 beeinflusst ebenfalls den Knochenstoffwechsel. Hierbei führt eine Erhöhung des FGF23 ebenso wie ein Mangel an FGF23 zu einer gestörten Mineralisation der Knochenmatrix [34, 59, 60].

In letzter Konsequenz kommt es durch FGF23 zu einer Verringerung des Serum-Phosphat-Spiegels und zu einer Verringerung des Calcitriol-Spiegels, was eine Hypocalciämie nach sich ziehen kann [8].

1.3.3 Aktuelle Sicht der Pathophysiologie

Mit der Entdeckung von FGF23 als einem zentralen Phosphatonin [33, 34], rückt die Phosphatretention als zentrales Moment bei der Entstehung des SHPT in den Fokus [61].

Die aktuell geläufige Hypothese ist, dass ein erhöhter PTH-Spiegel, wie auch ein erhöhter FGF23-Spiegel gemeinsam einer Hyperphosphatämie entgegenwirken, indem sie die renale Phosphatausscheidung stimulieren [62, 63]. Untersuchungen an Menschen [61] und Tieren [64] haben gezeigt, dass es im Frühstadium eines SHPT zuerst zu einem FGF23-Anstieg, gefolgt von einem PTH-Anstieg sowie einem Vitamin D-Abfall kommt [6]. Der Vitamin D-Abfall ist unter anderem auf eine Herunterregulation der 1α -Hydroxylase durch FGF23 zurückzuführen [34]. Bei massiver Proteinurie ist allerdings auch ein Verlust von Vitamin D bindendem Protein und damit von Vitamin D über den Urin möglich [65, 66].

1.3.4.3 Calcimimetika

Über eine Aktivierung des CaR der Nebenschilddrüsen kommt es zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber extrazellulärem Calcium und somit einer Abnahme der PTH-Sekretion [32].

1.3.4.4 Parathyreoidektomie

Die Verringerung des Nebenschilddrüsenvolumens durch chirurgische Resektion als ultima ratio führt zu einer verminderten Syntheseleistung und somit einer Reduktion des ausgeschütteten PTH [32].

Trotz eines besseren Verständnisses der Pathophysiologie des SHPT ist bisher eine optimale Strategie zur Prävention und zur Therapie eines SHPT bei prädialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nicht klar.

1.4 Ziel der Arbeit

In den vergangenen Jahren hat sich, vor allem seit der Entdeckung und Beschreibung von FGF23 als zentralem Element im Phosphat-Stoffwechsel, im Verständnis des SHPT einiges getan und die Sichtweise des SHPT hat sich hin zu einer phosphozentrischeren gewandelt.

Trotz eines besseren Verständnisses der Pathophysiologie des SHPT ist bisher eine optimale Strategie zur Prävention und zur Therapie eines SHPT bei prädialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nicht klar.

Die KDIGO-Leitlinien empfehlen im Falle niedriger Vitamin D-Spiegel eine Substitution mit Calcidiol und im Falle eines progressiven SHPT eine Substitution mit Calcitriol [2, 67]. Von einer phosphozentrischen Perspektive aus gesehen müsste es durch Therapie mit Vitamin D allerdings durch eine vermehrte Phosphatresorption aus dem Darm zu einer Erhöhung der Phosphatlast kommen. Dem steht entgegen, dass es sich bei Vitamin D um

einen potenten Suppressor der PTH-Expression handelt, dessen Spiegel bei chronischer Niereninsuffizienz erniedrigt ist [68]. Kuro-o spricht sich in einem Paper ebenfalls für eine phosphozentrische Sichtweise der CKD-MBD aus [69, 70]. FGF23 wird dort als Trigger für den Beginn einer Phosphatrestriktion vorgeschlagen, da dies im Sinne eines Surrogat-Markers für die Phosphatausscheidung pro Nephron, anders als der Plasma-Phosphatspiegel, Anzeichen für eine relative Phosphatüberladung liefere. Ziel dieser Sichtweise ist eine Verringerung der Phosphaturie, die über die Bildung von Calciprotein Partikeln (CPP), bestehend aus Phosphat, Calcium und Fetuin-A, ihre nephrodestruktive Wirkung vor allem auf die Nierentubuli entfaltet.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Entwicklung und der zeitliche Verlauf des SHPT in einem proteinurischen Mausmodell beobachtet. Das verwendete Mausmodell bildet sämtliche Stadien der chronischen Niereninsuffizienz ab [71] und geht mit einem Verlust von Vitamin D über den Urin einher [72]. Weiter wurden die Auswirkungen und die Effizienz gängiger Therapien - Phosphatrestriktion und Vitamin-D-Substitution - auf die Entwicklung und den Verlauf des SHPT untersucht. Hierbei wurde neben dem laborchemischen Therapieansprechen vor allem auch auf ein klinisches und histologisches Ansprechen hinsichtlich des Überlebens und der Nierenschädigung geachtet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Concentrator 5301	Eppendorf AG
Eppendorf Research® pro 20-300 µl (multi-channel)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (0,1 µl - 2,5 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (0,5 µl - 10 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (2 µl - 20 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (10 µl - 100 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (20 µl - 200 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (100 µl - 1000 µl)	Eppendorf AG
ELx800 Absorptions-Reader für Mikroplatten	BioTek®
Plattenschüttler	
Überkopfmischer	
LightCycler 1.5	Roche
CENTRIFUGE&VORTEX	neoLab®
Tpersonal Thermocycler	Biometra®
GeneQuant pro	GE Healthcare Biosciences
Biofuge 13	Heraeus Instruments
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
Liebherr Comfort Kühlschrank 2-8°C	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	
Gefrierschrank -80°C	
Vortex VF2	IKA®-Labortechnik
Flammenphotometer EFUX 5057	Eppendorf AG
Dräger Vapor® 2000 - Isoflurane	Dräger Medical GmbH
BioMate 3 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
MagNA Lyser	Roche
IL GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH

2. Material und Methoden

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Peha-soft® nitrile puderfreie Einmalhandschuhe	Hartmann
Standard Micro Test Tube 3810X	Eppendorf AG
Eppendorf PCR Tubes 0,2 ml	Eppendorf AG
Eppendorf PCR Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG
CELLSTAR® PP-Test tubes, 15 ml	greiner bio-one
CELLSTAR® TUBES, 50 ml	greiner bio-one
CELLSTAR® Cryo.s	greine labortechnik
ratiolab® Pipettenspitzen Gelb 1-200 µl	Ratiolab GmbH
Micro tube 0,5 ml PP	Sarstedt AG&Co.
epT.I.P.S. Standard 50-1000 µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen Standard MIKRO 0,1-10µl	Carl Roth GmbH+Co. KG
Reaction Tubes 1,5 ml PP, graduated	greiner bio-one
Luer-(Kapillar) Adapter ohne Sieb	Instrumentation Laboratory GmbH
Haematokrit Kapillaren 75 µl	Hirschmann® Laborgeräte
Einmal-Kapillarpipetten	Hirschmann® Laborgeräte
Blutgaskapillaren 280 µl	Hirschmann® Laborgeräte
UV-Küvette mikro 70 µl	Brand® GmbH
MagNA Lyser Green Beads	Roche
ep Dualfilter T.I.P.S.®, steril, 50-1000 µl	Eppendorf AG
ep Dualfilter T.I.P.S.®, steril, 1-200 µl	Eppendorf AG
ep Dualfilter T.I.P.S.®, steril, 0,1-10 µl	Eppendorf AG
Aluminium-Folie	
Light Cyler ® Capillaries (20 µl)	Roche

Tabelle 3: Verwendete Kits und Reagenzien

Kits, Reagenzien	Hersteller
LT-SYS® Gesamt-Eiweiß im Liquor/Urin Pyrogallolrot, flüssig (LT-UP 011)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Calcium Arsenazo III, modifiziert (LT-CA 0103)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Creatinin Jaffé, flüssig (LT-CR 0121)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Harnstoff enzymatisch (LT-UR 0010)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Phosphor, anorganisch (LT-PH 0100)	Labor+Technik EBERHARD LEHMANN GmbH

2. Material und Methoden

Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Cat.# 60-2305)	Immutopics, Inc.
Mouse PTH 1-84 sample diluent (Cat.# 30-2331)	Immutopics, Inc.
Mouse/Rat FGF-23 (C-Term) ELISA Kit (Cat.# 60-6300)	Immutopics, Inc.
sample diluents (Cat.# 30-6131)	Immutopics, Inc.
IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA	IDS, Immundiagnostic Systems GmbH
25-Hydroxy Vitamin D EIA	IDS, Immundiagnostic Systems GmbH
Tween 20	MERCK-Schuchardt
Aqua Dest	
Reiniger-D Flammenphotometer-Reinigungs-lösung	biorapid GmbH
Urin-Standard	biorapid GmbH
Serum-Standard	biorapid GmbH
Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorapid GmbH
System-Leerwertlösung	Eppendorf AG
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Formaldehyd Lösung 4,0% neutral gepuffert	Fischar®
RNeasy® Mini Kit (Cat. No. 74104)	QIAGEN N.V.
RNase-Free DNase Set (Cat. No. 79254)	QIAGEN N.V.
14,3 M β-Mercaptoethanol (β-ME)	
Ethanol (96 -100%)	
Ethanol (70%)	
Advantage® RT-for-PCR Kit (Cat.# 63906)	Clontech Laboratories, Inc.
LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Prod.No. 12015099001)	Roche
LightCycler™ –Primer Set Human GAPDH (Cat.# 486884)	Search LC GmbH Heidelberg

Tabelle 4: Eingesetzte Medikamente

Medikament	Hersteller
Isofluran CP® 1 ml/ml	cp-pharma® BURGDORF
DECOSTRIOL® inject 1 µg/ml Injektionslösung	mibe
D ₃ -Vicotrat® Injektionslösung	Heyl Chem.-pharm. Fabrik
DOXO-cell® 150 mg Injektionslösung	cell pharm GmbH
Isotonische Kochsalzlösung 0,9% , 100ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH

2. Material und Methoden

Tabelle 5: Verwendete Primer

Gen	sense/forward 5'→3' orientation	antisense/reverse 5'→3' orientation	Ampli- kon
1α-Hydroxylase; CYP27B1 (Gene ID: 13115)	GCATCACTTAACCCACTTCC	CGGGAAAGCTCATAGAGTGT	135 bp
24-Hydroxylase; CYP24A1 (Gene ID: 13081)	CCCTTCTGCAAGAAAAGTGC	CTCTTGAGGGCTCTGATTGG	232 bp
Klotho (Gene ID: 16591)	CCCTGTGACTTTGCTTGGG	CCCACAGATAGACATTCGGGT	91 bp
GAPDH (Gene ID: 14433)	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC	191 bp

Tabelle 6: In der Tierhaltung verwendete Produkte

Futter/Trinken	Hersteller
C1000 Kontrolldiät Ratte/Maus	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
C1048 Phosphatarme Diät (<0,1%)	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
C1000 + 5000 IE 25OH Vit. D	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
C1000 + 25000 IE 25OH Vit. D	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG
Fein Zucker	Südzucker AG
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse	ssniff® Spezialdiäten GmbH
Espen-Tiereinstreu AB	AsBe-Wood GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell

Die Studie war durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer M 7/11 genehmigt worden. Eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten für meine Person lag vor.

Die Versuche wurden an weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes 129 S1/SvImJ aus eigener Zucht durchgeführt. Die Zuchttiere wurden von Charles River Deutschland bezogen. Das mediane Alter der Tiere lag zu Versuchsbeginn bei 241 Tagen (104 Tage; 407 Tage). Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei 22-24°C Raumtemperatur in Käfigen gehalten. Futter und Trinken stand den Mäusen nach Belieben zur Verfügung. Die Induktion einer proteinurischen Niereninsuffizienz erfolgte durch eine einmalige Injektion einer variablen Doxorubicin-Dosis in den linken retrobulbären Venenplexus unter Isofluran-Narkose [71].

2.2.1.1 Tierverbrauch und Sterblichkeit

Über alle durchgeführten Versuche hinweg gesehen, verstarb etwa jedes fünfte Tier bevor der Endpunkt der jeweiligen Untersuchung erreicht wurde. Etwa 40% der injizierten Tiere hatten einen Krankheitsverlauf nach der unten beschriebenen CKD 1-3-Verlaufsform und waren nicht nephrotisch. Genauere Zahlen liefert Tabelle 7 auf Seite 93 im Anhang.

2.2.2 Studiendesign

Nach Transfer der Tiere in und Akklimatisierung an den Versuchsraum, wurde 7 Tage vor Versuchsbeginn das Futter durch das Versuchsfutter und das Trinkwasser durch 5%ige Saccharose-Lösung ersetzt.

2.2.2.1 Verlauf des SHPT

Um den Verlauf des SHPT zu untersuchen, wurden durch unterschiedlich hohe Doxorubicin-Dosierungen (4,5 µl/g KG - 7,5 µl/g KG) verschieden starke Verlaufsformen der Niereninsuffizienz ausgelöst. Anschließend wurde täglich über 10 bzw. 30 Tage der Gewichtsverlauf und die Fressmenge der Tiere verfolgt, sowie Spontanurin gewonnen. Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden die Tiere geopfert, ausgeblutet und die Nieren sowie die thorakale Aorta entnommen.

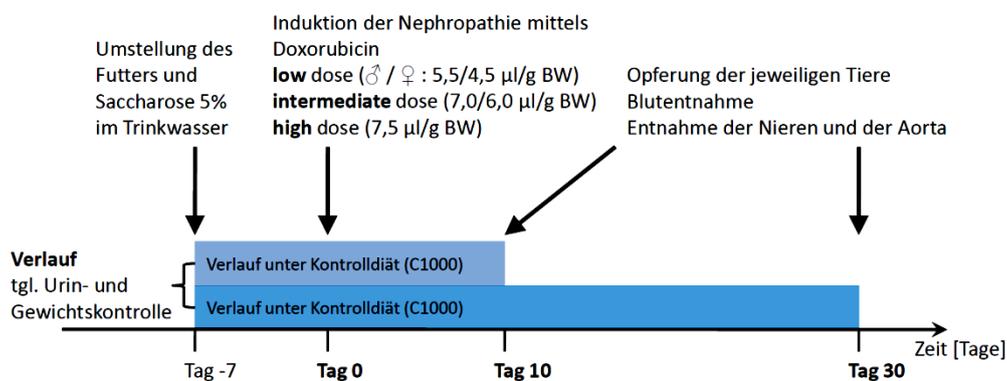


Abb. 2.1: Studiendesign: Verlauf des SHPT

2.2.2.2 Therapieversuch

Um die Wirkung verschiedener Therapien auf den SHPT zu untersuchen, wurde, wie oben beschrieben, durch niedrige und mittlere Doxorubicin-Dosen (4,5 µl/g KG - 7,0 µl/g KG) wiederum eine Niereninsuffizienz ausgelöst. Die Therapie erfolgte präemptiv entweder durch phosphatarmes Futter (Altromin, C1048), durch mit Calcidiol angereichertes Futter, durch intraperitoneale Gabe von Calcidiol oder durch intraperitoneale Gabe von Calcitriol. Unter Therapie wurde 10, 20 und 30 Tage nach Induktion der Niereninsuffizienz jeweils das Gewicht bestimmt und Spontanurin gewonnen. Nach 30 Tagen wurden die Tiere geopfert, ausgeblutet und die Nieren sowie die thorakale Aorta entnommen.

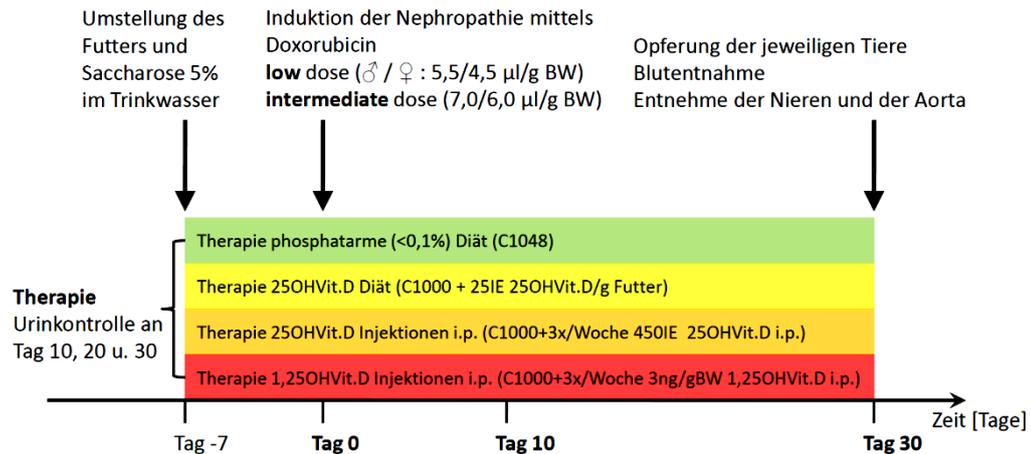


Abb. 2.2: Studiendesign: Therapieversuche

2.2.2.3 Interventionelle Therapie und Überlebensanalyse

Um die Therapieeffizienz und die Auswirkung auf das Überleben der Tiere zu untersuchen, wurde durch eine mittlere Doxorubicin-Dosis wiederum eine Niereninsuffizienz ausgelöst. Anhand der Plasmaspiegel von FGF23, Phosphat und Harnstoff sowie der Proteinurie zehn Tage nach Induktion wurden die Tiere einem Kontroll- und einem Therapiearm zugewiesen. Dies geschah so, dass sich die beiden Gruppen hinsichtlich der bestimmten Parameter statistisch nicht unterschieden. Therapiert wurde durch Phosphatrestriction, was sich bis dahin als am effizientesten gegenüber dem SHPT gezeigt hatte. Durch Laborkontrollen an Tag 20 und 30 wurde der weitere Verlauf über 30 Tage beobachtet. In der Nachbeobachtung bis Tag 103 wurde das Überleben der Tiere verfolgt.

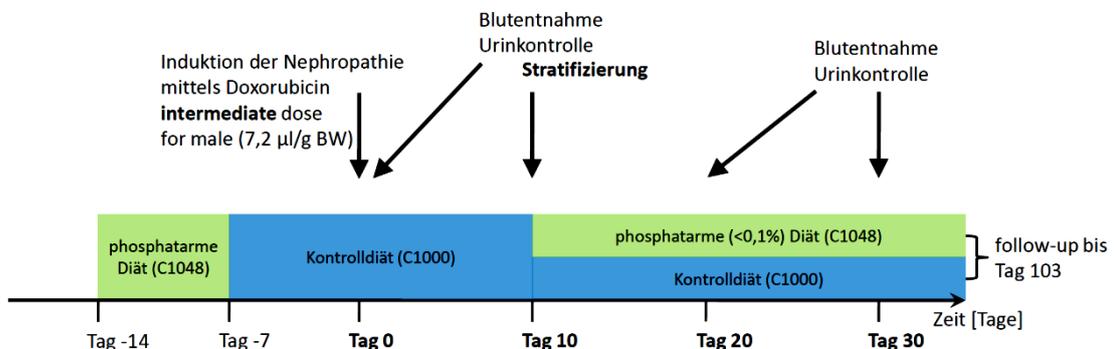


Abb. 2.3: Studiendesign: Interventionelle Therapie und Überlebensanalyse

2.2.3 Blut- und Urin-Parameter

Blutproben wurden mit Hilfe einer Mikrokapillare aus dem rechten retrobulbären, kapillären Venenplexus gewonnen und das nach anschließender Zentrifugation gewonnene Plasma bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Urinproben wurden als morgendlicher Spontanurin durch transabdominelle Blasenmassage gewonnen und anschließend bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.3.1 BGA

Ungefähr 150 µl frisch gewonnenes Kapillarblut wurden mit Hilfe des Analyseautomaten IL GEM® Premier 3000 (Instrumentation Laboratory GmbH) analysiert und folgende Parameter direkt bestimmt: pH, pCO₂, pO₂, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Hämatokrit bzw. durch den Analyseautomaten berechnet: Ca²⁺(pH 7,4), Bikarbonat, Standard-Bikarbonat, Base Excess, SO₂c, cHbc.

2.2.3.2 Klinische Chemie

Plasma Calcium - LT-SYS® Calcium Kit; Arsenazo III, modifiziert (LT-CA 0103)

Inhalt:

<i>Reagenz 1:</i>	<i>Imidazolpuffer, pH 6,5</i>	<i>100 mmol/l</i>
	<i>Arsenazo III</i>	<i>0,08 mmol/l</i>
	<i>Detergenzien</i>	
<i>Standard:</i>	<i>Calcium</i>	<i>2,5 mmol/l</i>

Bei dem LT-SYS® Calcium Kit handelt es sich um einen Farbttest mit Endpunktbestimmung. Arsenazo III reagiert mit Calcium in saurer Lösung unter Bildung eines violetten Farbkomplexes. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zur Calcium-Konzentration [73].

Durchführung:

3 µl Probe werden mit 300 µl Reagenz 1 zur Reaktion gebracht und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Absorption bei 600 nm bestimmt.

Die Calcium-Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$c[\text{Ca}^{2+}] = \text{Extinktion[Probe]} / \text{Extinktion[Standard]} * c[\text{Standard}]$$

Der Test ist bis zu einer Calciumkonzentration von 5,0 mmol/l linear. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe entsprechend mit Wasser (Ampuwa®) verdünnt werden.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,05 mmol/l Calcium.

Plasma und Urin Eiweiß - LT-SYS® Gesamt-Eiweiß im Liquor/Urin Kit; Pyrogallolrot, flüssig (LT-UP 011)

Inhalt:

Reagenz 1:	Pyrogallolrot	60 µmol/l
	Dinatriummolybdat	40 µmol/l
	Bernsteinsäure	50 mmol/l
	Di-Natriumoxalat	1 mmol/l
	Natriumbenzoat	3 mmol/l
	Natriumdodecylsulfat	86 µmol/l
Standard:	Eiweiß	1300 mg/l

Bei dem LT-SYS® Gesamt-Eiweiß im Liquor/Urin Kit handelt es sich um einen Farbtest mit Endpunktbestimmung. Pyrogallolrot bildet im sauren Milieu in Gegenwart von Molybdat-Ionen mit Eiweiß blaugefärbte Komplexverbindungen [74].

Durchführung:

3 µl Probe werden mit 300 µl Reagenz 1 zur Reaktion gebracht und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Absorption bei 600 nm bestimmt.

Die Eiweiß-Konzentration berechnet sich aufgrund einer Standardkurve (s. Anlage Seite 94) wie folgt:

$$c[\text{Eiweiß}] = -0,000106 + \sqrt{(0,000106^2 - 4 * -6,5543E-09 * (0,005305 - \text{Extinktion[Probe]})} / (2 * -6,5543E-09)$$

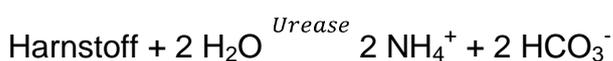
Der Messbereich bei Verwendung oben genannter Standardkurve reicht bis zu einer Eiweißkonzentration von 6 g/l. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe entsprechend mit Wasser (Ampuwa®) verdünnt werden.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 35 mg/l Eiweiß.

Plasma Harnstoff - LT-SYS® Harnstoff Kit; enzymatisch (LT-UR 0010)

Inhalt:		
Puffer:	Tris-HCl-Puffer, pH 7,8	100 mmol/l
	α -Ketoglutarat	6 mmol/l
	GLDH	≥ 9000 U/l
	NADH	0,2 mmol/l
	Adenosin-5-Diphosphat	2 mmol/l
	EDTA	4 mmol/l
	Stabilisatoren	
Enzym:	Urease	≥ 4000 U/l
Standard:	Harnstoff	40 mg/dl

Bei der Messmethode die dem LT-SYS® Harnstoff Kit zugrunde liegt, handelt es sich um eine vollenzymatische Reaktion mit Urease und Glutamatdehydrogenase (GLDH):



Die durch die Reaktion erfolgte Umwandlung von NADH zu NAD⁺ führt zu einer der Harnstoff-Konzentration proportionalen Extinktionsabnahme [75].

Durchführung:

Das lyophilisiert vorliegende *Enzym* wird in 16 ml Puffer bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend werden 3 μ l Probe mit 300 μ l gelöstem Enzym zur Reaktion gebracht und direkt im Anschluss die Absorption bei 340 nm gemessen. Nach 8 Minuten wird erneut die Absorption bei 340 nm bestimmt. Die Konzentration des Harnstoffs berechnet sich mit Hilfe der jeweiligen Extinktionsdifferenzen nun wie folgt:

$$c[\text{Harnstoff}] = \Delta\text{Extinktion}[\text{Probe}] / \Delta\text{Extinktion}[\text{Standard}] * c[\text{Standard}]$$

Der Test ist bis zu einer Harnstoffkonzentration von 300 mg/dl geeignet. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe entsprechend mit Wasser (Ampuwa®) verdünnt werden.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 2 mg/dl Harnstoff.

Plasma und Urin Phosphat - LT-SYS® Phosphor Kit; anorganisch (LT-PH 0100)

Inhalt:		
Reagenz1:	Ammoniummolybdat	12 mmol/l
	Schwefelsäure	2,2 mol/l

	<i>Detergenzien und Stabilisatoren</i>	
<i>Standard:</i>	<i>Phosphat</i>	<i>1,29 mmol/l</i>

Bei dem LT-SYS® Phosphor Kit handelt es sich um einen Farbttest mit Endpunktbestimmung. Anorganisches Phosphat bildet in schwefelsaurer Lösung einen Ammonium-Phosphomolybdat-Komplex. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zur Phosphat-Konzentration [76].

Durchführung:
3 µl Probe werden mit *300 µl Reagenz 1* zur Reaktion gebracht und nach einer Inkubationszeit von *10 min* die Absorption bei *340 nm* bestimmt. Die Phosphat-Konzentration berechnet sich nun wie folgt:
 $c[P_i] = \text{Extinktion}[Probe] / \text{Extinktion}[Standard] * c[Standard]$
Der Test ist bis zu einer Phosphatkonzentration von *4,84 mmol/l* linear. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe entsprechend mit Wasser (Ampuwa®) verdünnt werden.
Die untere Nachweisgrenze liegt bei *0,23 mmol/l* Phosphat.

Urin Kreatinin - LT-SYS® Creatinin Kit; Jaffé, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)

Inhalt:

<i>Reagenz1:</i>	<i>NaOH</i>	<i>300 mmol/l</i>
	<i>Di-Na-Phosphat</i>	<i>25 mmol/l</i>
<i>Reagenz2:</i>	<i>Pikrinsäure</i>	<i>8,7 mmol/l</i>
<i>Standard:</i>	<i>Creatinin</i>	<i>2 mg/dl</i>

Bei dem LT-SYS® Creatinin Kit handelt es sich um einen kinetischen Farbttest. Kreatinin, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure zur Reaktion gebracht, bildet einen orange-gelben Komplex, dessen Farbintensität photometrisch gemessen werden kann und sich proportional zur Kreatininkonzentration verhält [77].

Durchführung:
Zur Herstellung einer working solution werden Reagenz 1 und Reagenz 2 im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend werden *3 µl Probe* mit *200 µl working solution* zur Reaktion gebracht und *direkt* im Anschluss die *Absorption bei 492 nm* gemessen. *Nach 8 Minuten* wird erneut die Absorption bei *492 nm* bestimmt.
Die Kreatininkonzentration berechnet sich mit Hilfe der jeweiligen

Extinktionsdifferenzen nun wie folgt:

$$c[\text{Kreatinin}] = \Delta\text{Extinktion}[\text{Probe}] / \Delta\text{Extinktion}[\text{Standard}] * c[\text{Standard}]$$

Der Test ist bis zu einer Konzentration von 300 mg/dl Kreatinin im Urin linear.

Bei höheren Konzentrationen muss die Probe entsprechend mit Wasser (Ampuwa®) verdünnt werden.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,03 mg/dl Kreatinin.

2.2.3.3 Flammenphotometrie

Bei der direkten flammenphotometrischen Bestimmung wird die zu messende Lösung mit Pressluft vernebelt und der Nebel einem Acetylen- oder Leuchtgasbrenner zugeführt. Mittels eines selektierenden Farbfilters wird das Licht der für die Messung geeigneten Wellenlänge isoliert und dessen Intensität unmittelbar mit Hilfe einer Photozelle oder eines Photoelements gemessen [78].

Die Konzentrationen von Natrium, Calcium und Kalium im Urin wurden mithilfe des Flammenphotometers EFUX 5057 (Eppendorf AG) vollautomatisiert bestimmt. Konnte nicht genügend Urin gewonnen werden, bzw. lagen die gemessenen Werte außerhalb der Referenzbereiche (Na^+ : 10,0 - 300,0 mmol/l; K^+ : 5,0 - 200,0 mmol/l; Ca^{2+} : 0,5 - 20,0 mmol/l), so wurde der Urin in verdünnter Form manuell mit dem EFUX 5057 gemessen. Hierzu wurde die verdünnte Urinprobe in 1 ml der vom Gerät verwendeten Lithium-Lösung gegeben und dem Flammenphotometer manuell zur Messung vorgelegt.

2.2.3.4 ELISA und EIA

Die Analyse der Plasma-Hormone PTH, FGF23, Calcidiol sowie Calcitriol erfolgte aus dem bei Opferung der Tiere gewonnenen Plasma mittels ELISA bzw. EIA. Bei einem enzyme linked immunosorbend assay (ELISA) handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das eine enzymatische Farbreaktion nutzt.

Bei den hier zur Messung der PTH- und FGF-23-Konzentration verwendeten ELISAs, handelt es sich um sogenannte Sandwiche-ELISAs. Ein „capture“-

Antikörper bindet an einem Epitop des zu bestimmenden Antigens und fixiert diesen somit an einer festen Phase. Anschließend wird durch Waschen nicht gebundenes Antigen entfernt und ein zweiter „detection“-Antikörper hinzugegeben, der ein anderes Epitop des zu bestimmenden Antigens bindet. Dieser „detection“-Antikörper trägt das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase – HRP). Nach erneutem Waschen und Entfernen des nicht gebundenen „detection“-Antikörpers, wird ein Substrat der HRP zugegeben, welches von dieser umgesetzt wird und zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führt, der proportional zum gebundenen Antigen ist [4, 79].

Bei den hier zur Messung der 25-Hydroxy-Vitamin D- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration verwendeten Tests, handelt es sich um sogenannte kompetitive Immunoassays bzw. enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (EIA). Hier wird zur Detektion kein zweiter „detection“-Antikörper verwendet, sondern ein Kompetitor-Antigen, welches ebenfalls am „capture“-Antikörper bindet und mit HRP markiert ist. Nach einem Waschschrift wird ein Substrat der HRP zugegeben, welches von dieser umgesetzt wird und zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führt. Dieser ist umgekehrt proportional zur Konzentration des zu messenden Analyten [5, 80].

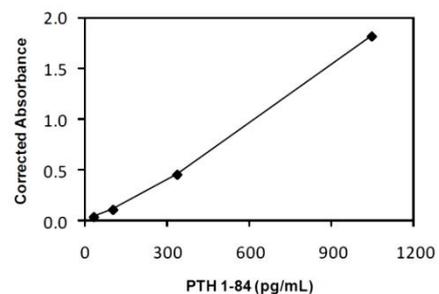
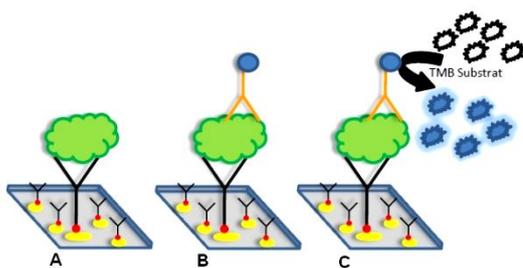


Abb. 2.4: Funktionsprinzip Sandwich-ELISA

Linker Bildteil: (A) Eine streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte bindet den biotinylierten „capture“-Antikörper, welcher den Analyten bindet. (B) Der „detection“-Antikörper der ebenfalls am Analyten bindet trägt das Enzym HRP. (C) Dieses setzt das zugegebene TMB Substrat um, was zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führt. grau – Mikrotiterplatte; gelb – Streptavidin; rot und schwarz – biotinylierter „capture“-Antikörper; grün – Antigen; orange und blau – „detection“-Antikörper mit HRP

Rechter Bildteil: Standardkurve am Beispiel des PTH-ELISAs [4]

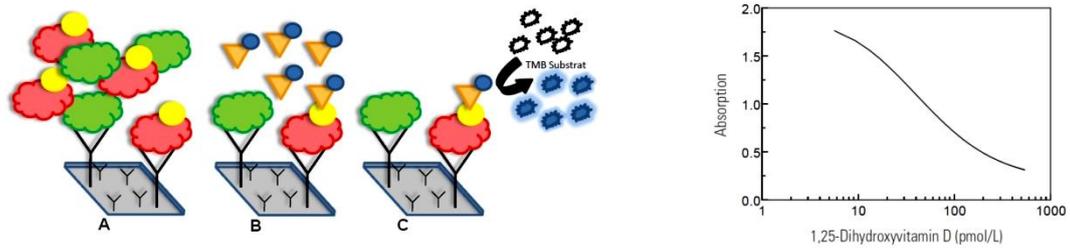


Abb. 2.5: Funktionsprinzip kompetitiver EIA

Linker Bildteil: (A) Der Analyt und ein weiteres biotin-markiertes Antigen konkurrieren um die Antikörperbindung auf der Mikrotiterplatte. (B) Es wird avidin-markierte HRP hinzugegeben, die über das Avidin an Biotin bindet. (C) Die HRP setzt das zugegebene TMB Substrat um, was zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führt. grau – Mikrotiterplatte; schwarz – Antikörper; grün – Analyt; rot und gelb – biotinyliertes kompetitives Antigen; orange und blau – avidin-markierte HRP
Rechter Bildteil: Standardkurve am Beispiel des Calcitriol EIA [5]

Plasma PTH - Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Cat.# 60-2305)

Inhalt:

Streptavidin coated microtiter plate (96 wells)
 mouse PTH 1-84 biotinylated Antibody
 mouse PTH 1-84 HRP conjugated antibody
 mouse PTH 1-84 standards (0 pg/ml; 32 pg/ml; 102 pg/ml; 336 pg/ml; 1045 pg/ml; 2616 pg/ml)
 liegen in lyophilisierter Form vor
 vor Gebrauch in 2 ml (0 pg/ml) bzw. 1 ml aqua dest. lösen
 ELISA wash concentrate nach Zugabe von 400 ml aqua dest. gebrauchsfertig
 ELISA HRP substrate TMB
 ELISA stop solution 1M Schwefelsäure
 plate sealer
 mouse PTH 1-84 sample diluent liegt in lyophilisierter Form vor; vor Gebrauch in 10 ml aqua dest. lösen

Plasma FGF-23 - Mouse/Rat FGF-23 (C-Term) ELISA Kit (Cat.# 60-6300)

Inhalt:

Streptavidin coated microtiter plate (96 wells)
 mouse FGF-23 biotinylated Antibody
 mouse FGF-23 HRP conjugated antibody
 mouse PTH 1-84 standards (0 pg/ml; 19,5 pg/ml; 64 pg/ml; 200 pg/ml; 640 pg/ml; 1910 pg/ml)
 liegen in lyophilisierter Form vor
 vor Gebrauch in 2 ml (0 pg/ml) bzw. 1 ml

<i>ELISA wash concentrate</i>	<i>aqua dest. lösen nach Zugabe von 400 ml aqua dest. gebrauchsfertig</i>
<i>ELISA HRP substrate</i>	<i>TMB</i>
<i>ELISA stop solution</i>	<i>1M Schwefelsäure</i>
<i>plate sealer</i>	
<i>sample diluent</i>	<i>liegt in lyophilisierter Form vor vor Gebrauch in 10 ml aqua dest. lösen</i>

Durchführung:

Wenn nicht anders beschrieben, gelten die aufgeführten Schritte sowohl für das Mouse PTH 1-84 ELISA Kit wie auch für das Mouse/Rat FGF-23 (C-Term) ELISA Kit.

Es werden 20 µl (PTH) bzw. 25 µl (FGF-23) Standard bzw. Probe in den mit Straptavidin beschichteten Wells vorgelegt.

Anschließend werden 50 µl der Antikörper working solution (Mischung der im Kit enthaltenen Antikörper im Verhältnis 1:1) zugegeben, die Mikrotiterplatte mit einem plate sealer verschlossen und in Aluminiumfolie verpackt.

Die Mikrotiterplatte wird für 3 h bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 180-220 rpm inkubiert.

Nach Ablauf der 3 h wird jedes Well fünf Mal mit je 300 µl der Waschlösung gewaschen.

Jetzt werden jedem Well 100 µl ELISA HRP substrate zugegeben, die Mikrotiterplatte mit einem plate sealer verschlossen und in Aluminiumfolie verpackt.

Die Mikrotiterplatte wird für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei 180-220 rpm inkubiert.

Nun wird innerhalb von 5 min die Absorption bei 650 nm gegen den 0 pg/ml Standard als Leerwert im ELx800 Absorptions-Reader (BioTek®) gemessen.

Nach Zugabe von 100 µl (PTH) bzw. 50 µl (FGF-23) ELISA stop solution wird innerhalb von 10 min die Absorption bei 450 nm gegen einen Leerwert aus 100 µl Substrat und 100 µl (PTH) bzw. 50 µl (FGF-23) stop solution gemessen.

Mit Hilfe der mitgemessenen Standards wird nun eine Standardkurve erstellt. Für Proben die eine Absorption kleiner der des 5. Standards aufweisen wird die Standardkurve mit Hilfe der bei 450 nm gemessenen Absorptionen der ersten 5 Standards ermittelt.

Für Proben die eine Absorption größer der des 5. Standards aufweisen wird die Standardkurve mit Hilfe der bei 650 nm gemessenen Absorptionen des 1., 4., 5. und 6. Standards ermittelt.

Proben, die bei 650 nm eine höhere Absorption als der 6. Standard aufweisen, müssen mit den entsprechenden Verdünnungslösungen verdünnt werden.

Die untere Nachweisgrenze des mouse PTH 1-84 beträgt 4 pg/ml (assay sensitivity).
Die untere Nachweisgrenze des mouse FGF-23 beträgt 4 pg/ml (assay sensitivity).

Plasma-Calcidiol - 25-Hydroxy Vitamin D EIA Kit

Inhalt:

<i>Antibody coated plate (96 wells)</i>	<i>25OH Vit. D sheep polyclonal antibodies</i>
<i>Calibrators</i>	<i>(0 nM; 6,8 nM; 14 nM; 27 nM; 67 nM; 179 nM; 380 nM)</i>
	<i>liegen in lyophilisierter Form vor</i>
	<i>vor Gebrauch in 1 ml aqua dest. lösen</i>
<i>Puffer</i>	
<i>25-D Biotin Concentrate</i>	<i>liegt in lyophilisierter Form vor</i>
	<i>durch Zugabe des Puffers erhält man die</i>
	<i>gebrauchsfertige 25-D Biotin Solution</i>
<i>Enzym Conjugate</i>	<i>PBS, avidin linked to HRP, Protein,</i>
	<i>Stabilisatoren und Konservierungsstoffe</i>
<i>TMB-Substrate</i>	
<i>Stop Solution</i>	<i>0,5M HCl</i>
<i>Wash Concentrate</i>	<i>PBS mit Tween</i>
	<i>nach Zugabe von 950 ml aqua dest.</i>
	<i>gebrauchsfertig</i>
<i>plate sealer</i>	

Durchführung:

6 µl Kalibrator bzw Probe werden in einem Tube mit 240 µl 25-D Biotin Solution gründlich vermischt.
200 µl hiervon werden auf die antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben, die Platte mit einem plate sealer verschlossen und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.
Anschließend werden die verwendeten Wells mit je 300 µl Waschlösung 3-mal gewaschen.
Danach wird in jedes Well 200 µl Enzymkonjugat gegeben, die Platte verschlossen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließend werden die verwendeten Wells mit je 300 µl Waschlösung 3-mal gewaschen.
Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette werden in jedes Well 200 µl TMB-Substrat gegeben, die Mikrotiterplatte mit einem plate sealer verschlossen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach Zugabe von 100 µl Stopplösung wird der Assay innerhalb von 30 min im ELx800 Absorptions-Reader (BioTek®) bei 450 nm (Referenz: 650 nm) ausgelesen.

Mit Hilfe der mitgemessenen Standards wird nun eine Standardkurve erstellt, anhand derer sich die Konzentrationen der Proben bestimmen lassen. Die Empfindlichkeit des Assays (assay sensitivity) für 25OH Vit. D liegt bei 5 nM.

Plasma-Calcitriol - IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA Kit

Inhalt:

<i>Immuncapsules</i>	<i>an eine Festphase gebundener monoclonal anti-1,25OH Vit. Antibody in suspension mit VDP Inhibitor</i>
<i>Delipidation Reagent</i>	<i>Dextransulfat und Magnesiumchlorid</i>
<i>Elution Reagent</i>	<i>Ethanol</i>
<i>Assay Puffer</i>	<i>BSA Puffer mit 0,09% NaCl</i>
<i>Antibody coated plate (96 wells)</i>	<i>anti-sheep IgG</i>
<i>Calibrators</i>	<i>(0 pM; 5,7 pM; 13,4 pM; 34 pM; 112 pM; 246 pM; 544 pM) liegen in lyophilisierter Form vor vor Gebrauch in 1 ml aqua dest. lösen</i>
<i>Primary Antibody Concentrate</i>	<i>sheep anti-1,25OH Vit. D</i>
<i>Primary Antibody Puffer</i>	<i>Primary Antibody Solution entsteht durch Mischen des Primary Antibody Concentrate mit dem Primary Antibody Puffer</i>
<i>1,25-D Biotin Puffer</i>	
<i>1,25-D Biotin Concentrate</i>	<i>liegt in lyophilisierter Form vor durch Zugabe des Puffers erhält man die gebrauchsfertige 1,25-D Biotin Solution</i>
<i>Enzym Conjugate</i>	<i>PBS, avidin linked to HRP, Protein, Stabilisatoren und Konservierungsstoffe</i>
<i>TMB-Substrate</i>	
<i>Stop Solution</i>	<i>0,5M HCl</i>
<i>Wash Concentrate</i>	<i>PBS mit Tween nach Zugabe von 950 ml aqua dest. gebrauchsfertig</i>
<i>plate sealer</i>	

Durchführung:

Vor der Durchführung des eigentlichen EIA wird durch Immunextraktion das in den Proben enthaltene 1,25OH Vit. D aufgereinigt. Zuvor werden die Proben noch entfettet.

Hierzu werden 125 µl Probe mit 12,5 µl Delipidation Reagent vermischt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Aus dem Überstand werden nun 100 µl der Probe in eine der Immunkapseln gegeben und diese wieder verschlossen.

Die Immunkapseln werden nun für 90 min bei Raumtemperatur Ende-über-Ende rotiert. Anschließend lässt man sich das Gel der Immunkapseln für 5 min setzen.

Der untere Verschluss der Immunkapseln wird abgebrochen, die Immunkapsel in ein Tube gestellt und der flüssige Inhalt der Kapseln bei 1000 rpm für eine Minute abzentrifugiert.

Nun wird die Immunkapsel mit je 500 µl aqua dest. und anschließendem Abzentrifugieren für 1 min bei 1000 rpm 3-mal gewaschen. Der Durchfluss wird verworfen.

In jede Immunkapsel werden nun 150 µl Elutionsreagenz gegeben. Um das Eluat zu gewinnen wird die Immunkapsel nach 2 min bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch 2-mal wiederholt und das Eluat gesammelt (Gesamtvolumen 450 µl).

Die Immunkapseln werden verworfen und das Eluat im Concentrator 5301 (Eppendorf AG) bei 30 °C unter Rotation und Vakuum verdunstet.

In jedes Tube werden nun 100 µl Assay Puffer gegeben um die Rückstände zu lösen.

Nun werden in weitere Tubes je 100 µl der Kalibratoren gegeben und zu allen Tubes je 100 µl der Primary Antibody Solution pipettiert und gut vermischt. Der Ansatz wird bei 2-8 °C für 16-20 h inkubiert.

150 µl der Lösung werden anschließend in je ein Well der antikörperbeschichteten Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wird mit einem plate sealer verschlossen und mit 500 rpm auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert.

Nun werden jedem Well 100 µl 1,25-D Biotin Solution zugegeben, die Platte mit einem plate sealer verschlossen und auf dem Plattenschüttler mit 500 rpm bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert.

Anschließend werden die verwendeten Wells mit je 300 µl Waschlösung 3-mal gewaschen.

Danach wird in jedes Well 200 µl Enzymkonjugat gegeben, die Platte verschlossen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die verwendeten Wells mit je 300 µl Waschlösung 3-mal gewaschen.

Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette werden in jedes Well 200 µl TMB-Substrat gegeben, die Mikrotiterplatte mit einem plate sealer verschlossen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 100 µl Stopplösung wird der Assay innerhalb von 30 min im ELx800 Absorptions-Reader (BioTek®) bei 450 nm (Referenz: 650 nm) gegen einen Leerwert aus 200 µl Substrat und 100 µl Stopplösung gemessen.

Mit Hilfe der mitgemessenen Standards wird nun eine Standardkurve erstellt, anhand derer sich die Konzentrationen der Proben bestimmen lassen.

Die Empfindlichkeit des Assays (assay sensitivity) für 1,25OH Vit. D liegt bei 6 pM.

2.2.4 Gewebeanalysen

2.2.4.1 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR wurde in jeweils der rechten Niere, die nach Opferung der Tiere rasch entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert wurde, die Enzymproduktion der 24-Hydroxylase (CYP24A1) und der 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) sowie die Translationsaktivität für den Co-Faktor am FGF-Rezeptor, Klotho, indirekt über die jeweilige mRNA bestimmt.

Bei der RTQ-PCR handelt es sich um das derzeit gängigste Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Nach RNA-Isolation und Transkription in cDNA wird während einer herkömmlichen PCR mittels Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Hierzu wird ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, hier SYBR® Green I, verwendet, der in die amplifizierte DNA interkaliert und so zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Zur Quantifizierung der zu untersuchenden Templatmenge wird die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Zu Beginn der PCR findet eine nahezu exponentielle Amplifikation statt, die sich dann zu einem linearen Wachstum verlangsamt und schließlich zum Erliegen kommt. Als CT-Wert (cycle threshold) ist die Zykluszahl definiert, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Mit Hilfe der C_T-Werte parallel amplifizierter bekannter Templatmengen wird nun eine Standardkurve erstellt, woraus dann umgekehrt durch die gemessenen C_T-Werte auf die Templatmenge geschlossen werden kann.

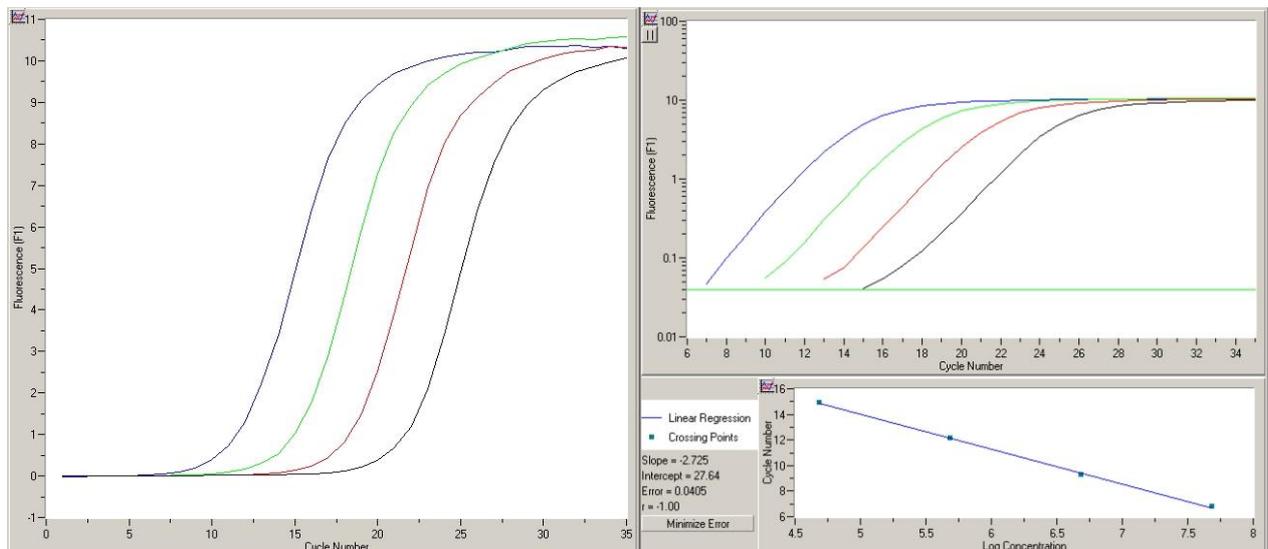


Abb. 2.6: Prinzip der RTQ-PCR am Beispiel GAPDH

(Links) Fluoreszenzkurven für vier Amplifikationen mit unterschiedlicher Template-DNA-Menge. (Rechts oben) Logarithmierte Darstellung der obigen Kurven. Die C_T -Werte (Schnittpunkt mit der noise – horizontale grüne Linie) werden in einem Bereich der Kurve ermittelt, an dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft. (Rechts unten) Durch Auftrag der ermittelten C_T -Werte gegen den Logarithmus der zu Beginn eingesetzten DNA-Menge erhält man eine Standardkurve. Anhand dieser kann mit Hilfe gemessener C_T -Werte von Proben die jeweils in den Proben vorhandene DNA-Menge ermittelt werden.

Da die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs nicht spezifisch ist und somit nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden kann, muss zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Bei einer für jedes DNA-Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert die zuvor doppelsträngige DNA, wobei der darin gebundene Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird, was eine Abnahme der Fluoreszenz nach sich zieht. Eine Unterscheidung ist nun anhand der Schmelztemperatur möglich. Doppelsträngige spezifische PCR-Produkte weisen eine höhere Schmelztemperatur auf, als unspezifische Nebenprodukte. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve korreliert mit der Menge des gebildeten Fragments [81, 82].

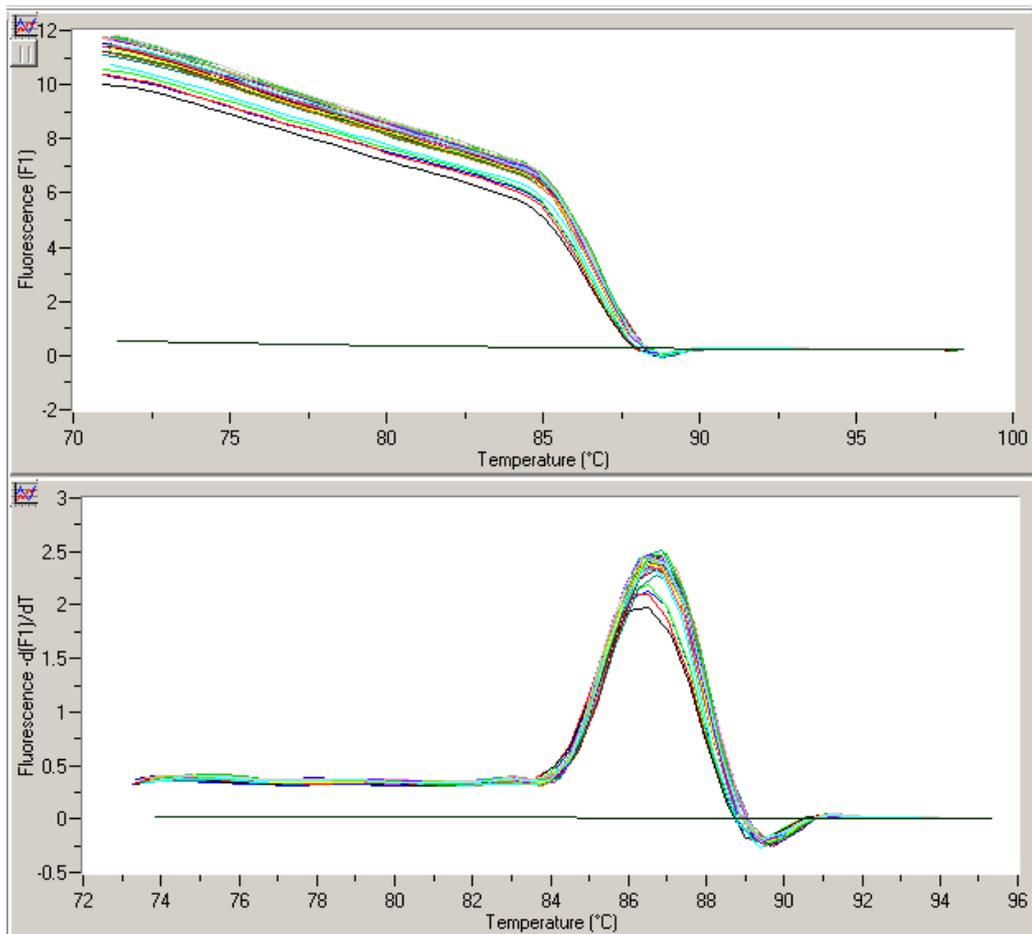


Abb. 2.7: Schmelzkurvenanalyse am Beispiel GAPDH

Die Schmelzkurve zeigt einen einheitlichen Schmelzpunkt aller analysierten Proben, d.h. in allen Proben wurde das gleiche Produkt gebildet, im Beispiel GAPDH.

RNA-Isolierung

RNeasy® Mini Kit (Cat. No. 74104)

Inhalt:

RNeasy Mini Spin Columns (pink)

Collection tubes (1,5 ml)

Collection tubes (2,0 ml)

RLT Puffer

pro ml RLT Puffer 10 µl β-ME zugeben

RW1 Puffer

RPE Puffer

*Konzentrat (vor Gebrauch das vierfache Volumen
Ethanol (96-100%) zugeben)*

RNase-Free water

RNase-Free DNase Set (Cat. No. 79254)

Inhalt:

DNase I, RNase-Free (lyophilized)

*1500 Kunitz units in 450 µl
RNase-Free water lösen*

RDD Puffer

RNase-Free water

Durchführung:

20-30 mg werden auf Hilus-Ebene aus der tiefgefrorenen Niere gewonnen und im MagNA-Lyser ca. 50 s bei 5000 rpm in einem Tube mit 600 µl RLT Puffer und MagNaA Lyser Green Beads lysiert.

Das Lysat wird zunächst mit Hilfe einer Spritze homogenisiert, bei maximaler Geschwindigkeit 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Tube überführt.

Durch Zugabe des gleichen Volumens Ethanol 70% kommt es zur Nukleinsäure-Fällung. Anschließend wird die Probe auf eine RNeasy Mini Spin Column überführt und der Durchfluss nach 15 s Zentrifugation bei 11000 rpm verworfen.

Nun wird die RNeasy Mini Spin Column mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Nach 15 s Zentrifugation bei 11000 rpm wird der Durchfluss verworfen.

Pro RNeasy Mini Spin Column 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase I mischen und auf die Säule geben. Anschließend 15 min inkubieren.

Nun wird die RNeasy Mini Spin Column mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Nach 15 s Zentrifugation bei 11000 rpm wird der Durchfluss verworfen.

Anschließend zwei Mal je 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben und nach Zentrifugation bei 11000 rpm den Durchfluss verwerfen. Bei Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit wird die Membran der RNeasy Mini Spin Column getrocknet.

Nun wird die isolierte RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Das gewonnene Eluat kann nun bei -70 °C gelagert werden bzw. es wird direkt mit der Transkription in cDNA fortgeföhren.

Transkription der mRNA in cDNA

Advantage® RT-for-PCR Kit (Cat.# 63906)

Inhalt:

5X Reaction Puffer

*250 mM Tris-HCl, pH 8,3
375 mM KCl
15 mM MgCl₂*

Oligo (dT)₁₈ Primer

20 µM

Random Hexamer Primer

20 µM

MMLV Reverse Transcriptase

200 units/µl

(MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus, recombinant)

Recombinant RNase Inhibitor

40 units /µl

dNTP Mix 10 mM each
DEPC-treated Water
(treated with diethyl pyrocarbonate (1:1000) and autoclaved)

Durchführung:

Mit Hilfe des GeneQuant pro Photometers wird die Konzentration der bei der RNA Isolation gewonnenen RNA bestimmt.

Die folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt.

In einem sterilen Tube werden 1 µg RNA in 12,5 µl DEPC-treated Water vorgelegt, 1 µl oligo(dT) Primer zugegeben und 2 min im Thermocycler auf 70°C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß für 2 min auf Eis gekühlt.

Zu jeder RNA Probe werden nun 6,5 µl Mastermix (4,0 µl 5X reaction buffer; 1,0 µl dNTP Mix; 1,0 µl MMLV reverse transcriptase; 0,5 µl recombinant RNase inhibitor) gegeben und durch auf- und abpipettieren gut vermischt.

Die Tubes werden nun 1 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert, dann 5 min auf 94 °C erhitzt, um die cDNA Synthese abzubrechen.

Die synthetisierte cDNA wird bei -20 °C gelagert.

RTQ-PCR

LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Prod. No. 12015099001)

Inhalt:

LightCycler® DNA Master SYBR Green I

MgCl₂ Stock Solution 25 mM

DEPC-treated Water

(treated with diethyl pyrocarbonate (1:1000) and autoclaved)

Primer:

1α-Hydroxylase (CYP27B1)

sense: GCA TCA CTT AAC CCA CTT CC

antisense: CGG GAA AGC TCA TAG AGT GT

final concentration je 1,0 µM

24-Hydroxylase (CYP24A1)

sense: CCC TTC TGC AAG AAA ACT GC

antisense: CTC TTG AGG GCT CTG ATT GG

f. c. je 0,5 µM

Klotho

sense: CCC TGT GAC TTT GCT TGG G

antisense: CCC ACAG ATA GAC ATT CGG GT

f. c. je 0,3 µM

GAPDH (housekeeping gene)

sense: AAC GAC CCC TTC ATT GAC

antisense: TCC ACG ACA TAC TCA GCA C

f. c. je 1,0 µM

Durchführung:

Es werden 2 µl der transkribierten cDNA mit 3,2 µl MgCl₂-Lösung (5mM) für 1α- und 24-Hydroxylase bzw. 2,4 µl MgCl₂-Lösung (4mM) für Klotho und GAPDH, 1 µl Primerlösung (je 0,5 µl sense- bzw. antisense-Primer) sowie 2 µl LightCycler® DNA Master SYBR Green I und 12,6 µl DEPC-treated water im LightCycler® zur Reaktion gebracht.

Die Amplifikation findet in jeweils Produkt-spezifischen Sequenzen statt:

1α-Hydroxylase (CYP27B1) und 24-Hydroxylase (CYP24A1):

3 Minuten Aktivierung bei 95°C (Denaturierung), dann 45 Zyklen zu je 15s bei 95°C (Denaturierung), 20 s bei 56°C (Annealing) und 20 s bei 72°C (Extension)

Klotho:

2 min Aktivierung bei 95°C, dann 40 Zyklen zu je 15 s bei 95°C, 15 s bei 55°C und 20 s bei 72°C

GAPDH:

10 min Aktivierung bei 95°C, dann 35 Zyklen zu je 15 s bei 95°C, 10 s bei 69°C und 9 s bei 72°C

Es wird eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätskontrolle der RTQ-PCR durchgeführt.

Die gemessenen Kopienzahlen der Ziel-Gene werden auf diejenige des housekeeping Gens GAPDH bezogen.

2.2.4.2 Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden an der jeweils linken Niere sowie der thorakalen Aorta, die nach Opferung der Tiere entnommen und in 4%iger Formalin-Lösung aufbewahrt wurden, durch die Nephropathologische Abteilung des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Erlangen durchgeführt.

Die Nierenschnitte wurden mittels PAS-Reaktion gefärbt und anschließend hinsichtlich pathologischer Veränderungen untersucht. Außerdem wurden die Nieren und Aorten mittels von-Kossa-Färbung auf Verkalkungen hin untersucht.

Das Ausmaß der Schädigung der Glomeruli wurde mit Hilfe des Glomerulosklerose-Indexes (GSI) bestimmt. Hierzu wurden unter 400-facher Vergrößerung 50 Glomeruli hinsichtlich ihrer Schädigung beurteilt und, wie von el Nahas et al. beschrieben, in fünf Stadien unterteilt [83].

Analog zum GSI dient der tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI) der Beurteilung der tubulären Schädigung. Unter 200-facher Vergrößerung wurden in der Mark-Rindengrenze 12 Gesichtsfelder hinsichtlich der tubulären Schädigung beurteilt und, wie von Véniant et al. beschrieben, in vier Stadien unterteilt [84].

Die mikroskopische Untersuchung der thorakalen Aorten erfolgte mit der Fragestellung nach einer eventuell vorhandenen Sklerosierung bzw. Verkalkung mit Hilfe einer von-Kossa-Silberfärbung.

2.2.4.3 Statistik

Die Datenauswertung wurde mit Hilfe von Microsoft Office EXCEL 2007 und der Statistiksoftware GraphPad Prism 5 durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden jeweils Mittelwerte und die dazugehörigen SEM ermittelt. Zur Überprüfung einer Normalverteilung wurden folgende Tests herangezogen: KS normality test, D'Agostino & Pearson omnibus normality test und Shapiro-Wilk normality test. Die Ergebnisse wurden als nicht normalverteilt behandelt, sobald dies einer der Tests anzeigte. Die Varianzanalyse erfolgte mittels One-way ANOVA bei Normalverteilung bzw. mittels Kruskal-Wallis Test bei nicht normalverteilten Werten. Zur Signifikanzanalyse wurde bei Normalverteilung ein Dunnett-, Bonferroni- oder Tuckey-Posttest oder ein student's t-test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Ergebnissen kam ein Dunn-Posttest zur Anwendung. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwert \pm SEM angegeben bzw. dargestellt.

3.1 Entwicklung und Verlauf des SHPT

3.1.1 Induktion des Modells und Klinischer Verlauf

Analog der drei verschiedenen, für die Induktion des Modells verwendeten Doxorubicindosen ließen sich drei unterschiedlich stark ausgeprägte Verlaufsformen der Niereninsuffizienz und des SHPT beobachten. Diese drei Verlaufsformen werden im Folgenden in Anlehnung an die KDIGO-Stadien CKD 1-3 und CKD 4-5 sowie an ein akutes Nierenversagen (AKI) benannt.

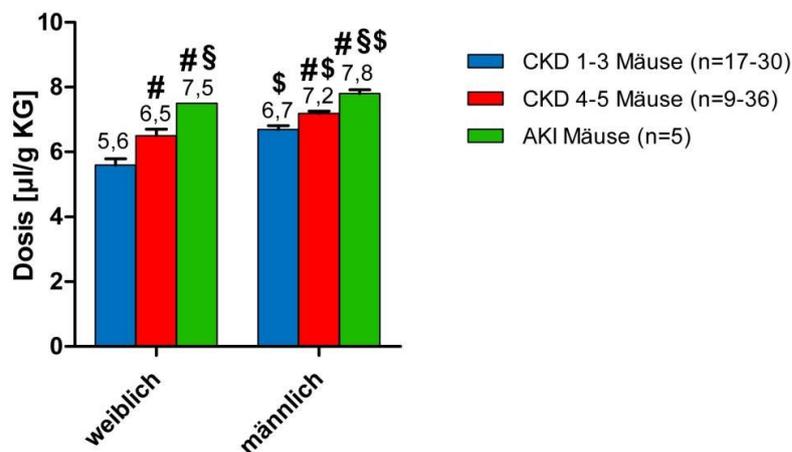


Abb. 3.1: Induktionsdosis

Dargestellt ist die für die Induktion der jeweiligen Verlaufsform nötige Toxindosis als Mittelwert \pm SEM in der Einheit $\mu\text{l/g KG}$
#: $p < 0,05$ vs CKD 1-3-Mäuse; §: $p < 0,05$ vs CKD 4-5-Mäuse; \$: $p < 0,05$ vs weiblich

Rückschließend ließen sich für die Weibchen mit $5,6 \pm 0,19 \mu\text{l/g KG}$, $6,5 \pm 0,20 \mu\text{l/g KG}$ und $7,5 \pm 0,00 \mu\text{l/g KG}$ sowie für die Männchen mit $6,7 \pm 0,12 \mu\text{l/g KG}$, $7,2 \pm 0,06 \mu\text{l/g KG}$ und $7,8 \pm 0,12 \mu\text{l/g KG}$ je drei signifikant verschiedene Toxindosen ermitteln, um die unterschiedlich schweren Verlaufsformen der Niereninsuffizienz und des SHPT zu generieren.

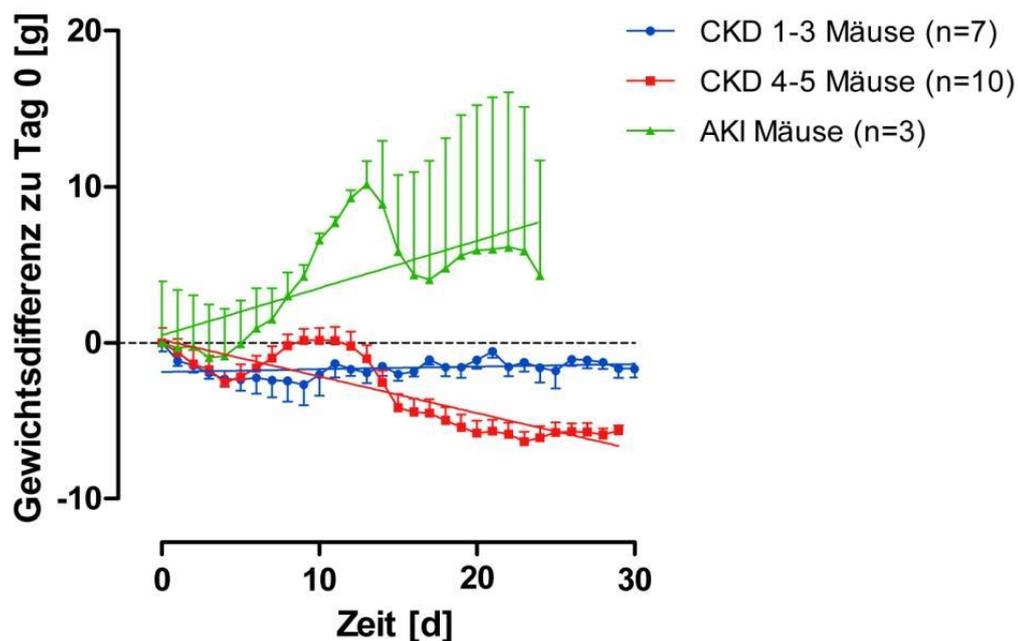


Abb. 3.2: Gewichtsverlauf nach Induktion

Dargestellt ist für die jeweilige Gruppe die Gewichtsänderung zum Induktionstag als Mittelwert \pm SEM in der Einheit g sowie jeweils eine Regressionsgerade

Bei der Beobachtung des Gewichtsverlaufs der Mäuse nach Induktion ließen sich klinisch drei unterschiedliche Verlaufsformen erkennen, welche sich im weiteren Verlauf auch laborchemisch unterscheiden ließen.

Die CKD 1-3-Mäuse verloren zu Beginn moderat an Gewicht und hielten sich dann mit einem mittleren Gewichtsverlust von $1,65 \pm 0,09 \text{ g}$ stabil.

Die CKD 4-5-Mäuse zeigten einen kontinuierlichen Gewichtsverlust auf zuletzt $5,64 \pm 0,35 \text{ g}$. Dieser kontinuierliche Gewichtsverlust wurde zwischen den Tagen 4 bis 15 durch eine vorübergehende Gewichtszunahme mit

zwischenzeitlichem Erreichen des Ausgangsgewichtes unterbrochen. Klinisch imponierte diese Gewichtszunahme als ödematös bedingt, mit zunehmendem Bauchumfang und Aszites.

Die AKI-Mäuse zeigten nach anfänglich minimalem Gewichtsverlust ebenfalls zwischen den Tagen 3 bis 16 eine deutliche, ödembedingte Gewichtszunahme (s. Abb. 3.3 B-C) mit *Punctum maximum* an Tag 13 mit $10,16 \pm 1,51$ g. Über den 30-tägigen Verlauf verblieb bei diesen Mäusen im Mittel allerdings eine tendenziell positive Gewichtsbilanz mit $4,30 \pm 7,41$ g.

Bei den Blutentnahmen an Tag 10 zeigte sich bei den Mäusen der CKD 4-5- und AKI-Verlaufsform eine makroskopisch sichtbare Hyperlipidämie (s. Abb. 3.3 E).

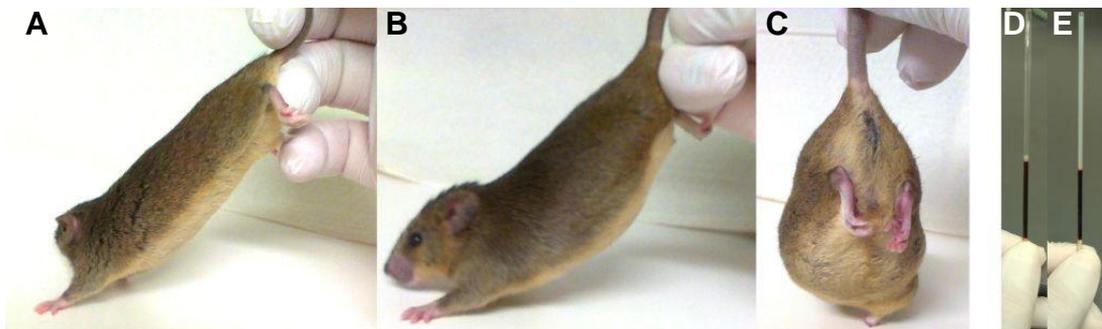


Abb. 3.3: Klinischer Verlauf

Dargestellt ist jeweils eine für die Erkrankungsphase typische Maus (A-C), wobei Bild A eine gesunde Maus in posterolateraler Ansicht zeigt. Bild B und C zeigen eine Maus mit CKD 4-5-Verlaufsform im Stadium der durch Aszites bedingten Körperumfangszunahme. Bild D bzw. E zeigen jeweils Blut einer gesunden Maus (D) und einer Maus mit der Verlaufsform CKD 4-5 an Tag 10 (E) nach Zentrifugation. Zu sehen sind 3 Phasen: Als Überstand das Plasma, in der Mitte der buffy coat, sowie am Boden die Erythrozyten-Phase (z.T. ist unten noch ein Wachstverschlussstopfen zu erkennen). Das Plasma der CKD 4-5-Maus zeigt im Vergleich zur gesunden Maus eine deutliche Hyperlipidämie.

3.1.2 Nierenfunktion

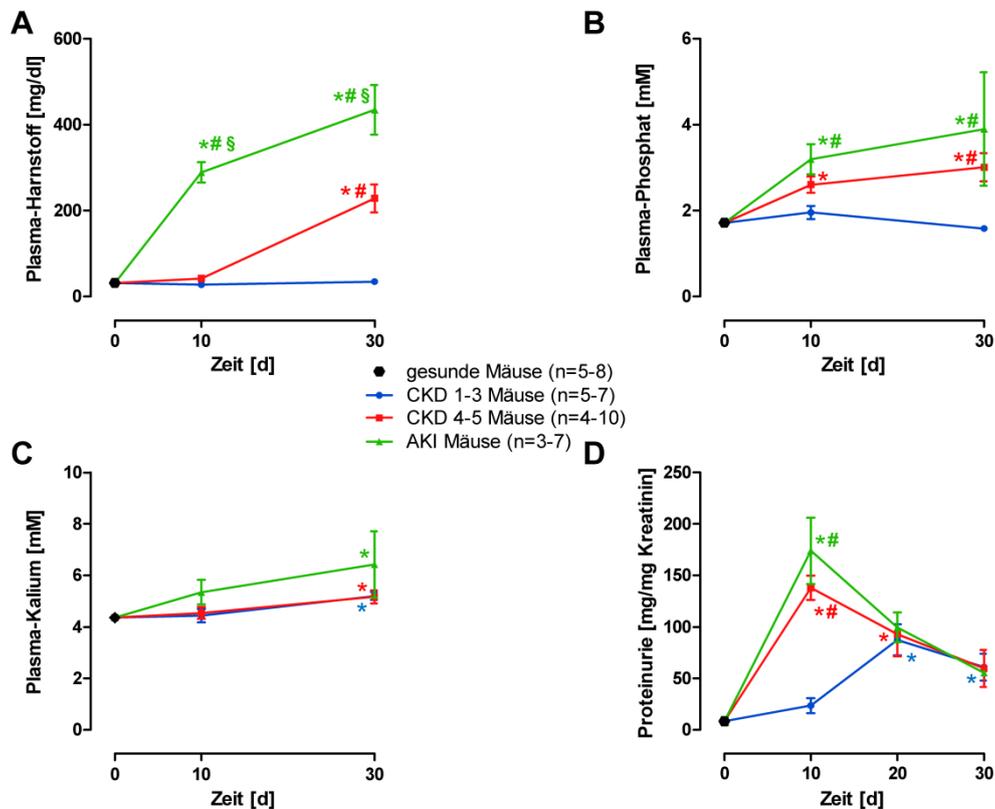


Abb. 3.4: Nierenfunktionsparameter im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100]

Dargestellt ist der Verlauf folgender Nierenfunktionsparameter jeweils als Mittelwert \pm SEM: Plasma-Harnstoff in der Einheit mg/dl (A), Plasma-Phosphat in der Einheit mM (B), Plasma-Kalium in der Einheit mM (C) und die Proteinurie in der Einheit mg/mg Kreatinin (D).

*: $p < 0,05$ vs gesunde Tiere; #: $p < 0,05$ vs CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ vs CKD 4-5-Tiere

Die Nierenfunktionsparameter zeigten die unterschiedlich schnelle und unterschiedlich starke Entwicklung einer Nephropathie mit drei Verlaufsformen:

Eine Verlaufsform mit nur leicht bis mäßig verminderter GFR (CKD 1-3) und konsekutiv nahezu unveränderten Plasma Harnstoff- und Phosphatwerten. Hier trat eine im Verlauf zunehmende Proteinurie mit maximal 87 ± 15 mg/mg Kreatinin, sowie eine kontinuierliche Erhöhung des Plasma Kaliums von $4,36 \pm 0,08$ mM auf $5,20 \pm 0,15$ mM auf.

Eine weitere Verlaufsform zeigte eine stark verminderte GFR (CKD 4-5),

wobei es hier nach anfangs nur unwesentlichem Anstieg ab Tag 10 zu einem deutlichen Harnstoffanstieg im Plasma von 42 ± 6 mg/dl auf 228 ± 32 mg/dl an Tag 30, das ca. 5,4-fache, kam. Konsekutiv kam es zu einem kontinuierlichen Phosphatanstieg im Plasma von zu Beginn $1,72 \pm 0,08$ mM auf das ca. 1,8-fache an Tag 30. Der Kaliumanstieg im Plasma fiel vergleichbar mit der Vorgruppe aus, die Proteinurie unterschied sich mit einem Spitzenwert von 138 ± 12 mg/mg Kreatinin an Tag 10 deutlich von der Vorgruppe. Die Proteinurie fiel mit abnehmender Nierenfunktion kontinuierlich auf ca. 43% des Spitzenwertes ab. In Zusammenschau mit den oben beschriebenen klinischen Beobachtungen entwickelten die Mäuse dieser Verlaufsform um Tag 10 ein klassisches nephrotisches Syndrom mit ausgeprägter Ödembildung, deutlicher Proteinurie und Hyperlipidämie.

Die dritte abgrenzbare Verlaufsform zeigte, einem akuten Nierenversagen (AKI) entsprechend, bereits an Tag 10 einen deutlichen GFR-Verlust mit einem Harnstoffanstieg an Tag 10 auf das ca. 9,2-fache des Ausgangswertes und einem weiteren Anstieg auf 434 ± 58 mg/dl, was etwa dem 13,8-fachen des Ausgangswertes entspricht. Konsekutiv kam es zu einem kontinuierlichen Phosphatanstieg im Plasma auf $3,9 \pm 1,3$ mM an Tag 30. Der Kaliumanstieg fiel in dieser Gruppe nicht signifikant stärker zu den anderen beiden Verlaufsformen aus. Die Proteinurie zeigte einen mit der CKD 4-5-Gruppe vergleichbaren Verlauf. Hier lag der Spitzenwert an Tag 10 bei 174 ± 32 mg/mg Kreatinin. Die Proteinurie fiel mit abnehmender Nierenfunktion kontinuierlich auf ca. 32% des Spitzenwertes ab. Die AKI-Verlaufsform zeigte ebenfalls klinisch wie laborchemisch ein ausgeprägtes nephrotisches Syndrom mit ausgeprägter Ödembildung, deutlicher Proteinurie und Hyperlipidämie.

3.1.3 Endokrinologischer Verlauf

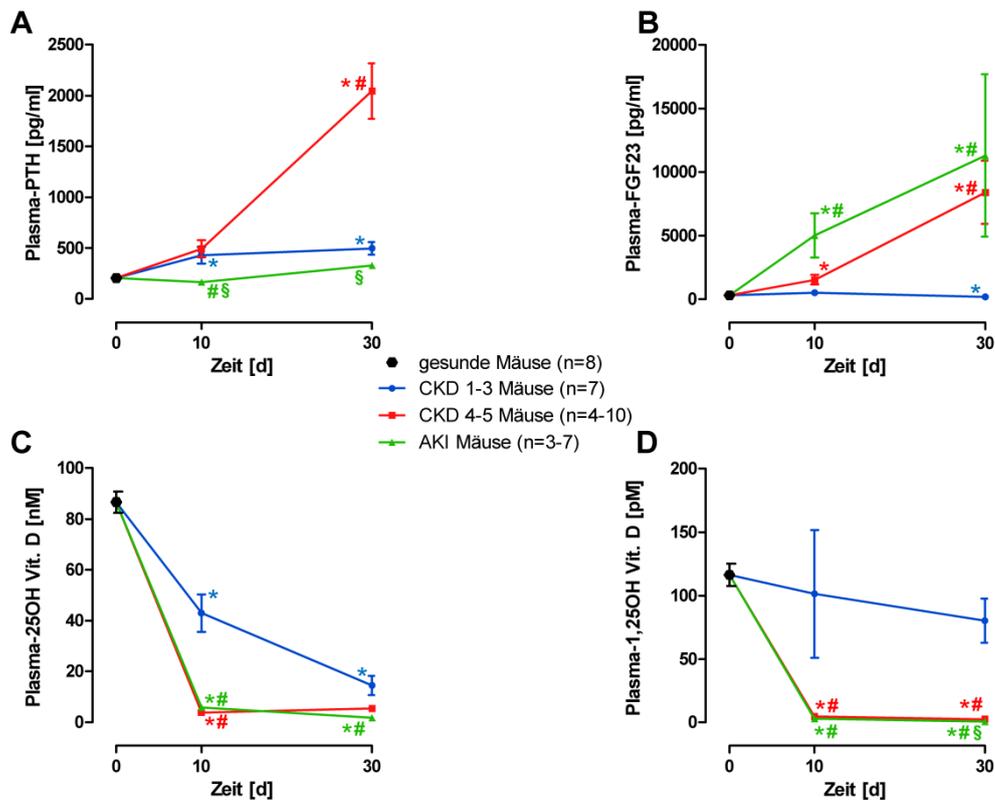


Abb. 3.5: Endokrinologische Parameter im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100]

Dargestellt ist der Verlauf folgender endokrinologischer Parameter jeweils als Mittelwert \pm SEM: Plasma-PTH in der Einheit pg/ml (A), Plasma-FGF23 in der Einheit pg/ml (B), Plasma-25-Hydroxy-Vitamin D in der Einheit nM (C) und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D in der Einheit pM (D).

*: $p < 0,05$ vs gesunde Tiere; #: $p < 0,05$ vs CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ vs CKD 4-5-Tiere

Analog zu den Beobachtungen der Nierenfunktionsparameter zeigten sich beim Verlauf über 30 Tage drei verschiedene Ausprägungsformen eines SHPTs.

Bei den CKD 1-3-Mäusen kam es zu einem signifikanten, kontinuierlichen Anstieg des Plasma PTH über 30 Tage auf mit 497 ± 62 pg/ml das ca. 2,4-fache des Ausgangswertes im Sinne eines SHPT. Das FGF-23 zeigte im Verlauf an Tag 10 zunächst einen signifikanten Anstieg auf 500 ± 85 pg/ml um anschließend auf 172 ± 32 pg/ml, ca. 55% des Ausgangswertes an Tag 0, abzufallen. Die Plasmakonzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D fiel im

Verlauf von 30 Tagen signifikant auf ca. 17% des Ausgangswertes von 87 ± 4 nM ab. Die 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration fiel auf ca. 69% des Ausgangswertes von 116 ± 9 pM weniger stark.

Die CKD 4-5-Mäuse erreichten mit einem mittleren PTH von 2045 ± 272 pg/ml die höchste PTH Konzentration der drei Verlaufsformen. Der FGF23-Anstieg verlief kontinuierlich bis zu einem Spitzenwert von 8402 ± 2487 pg/ml an Tag 30. 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D waren mit einem Abfall auf ca. 6% bzw. ca. 2% der jeweiligen Ausgangswerte von 87 ± 4 nM bzw. 116 ± 9 pM nahezu nicht mehr nachzuweisen.

Die Mäuse, die eine AKI entwickelten, fielen durch einen verzögerten PTH-Anstieg nach Tag 10 auf. Mit einem Anstieg auf 329 ± 29 pg/ml, das ca. 1,6-fache des Ausgangswertes, fiel dieser nicht signifikant aus und wurde daher nicht im Sinne eines SHPT gewertet. Der FGF23-Spiegel erreichte nach kontinuierlichem Anstieg im Vergleich mit 11299 ± 6394 pg/ml an Tag 30 die höchsten Werte. 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D zeigten mit einem Abfall auf ca. 2% bzw. ca. 0,6% der jeweiligen Ausgangswerte von 87 ± 4 nM bzw. 116 ± 9 pM einen noch stärkeren Abfall als bei den Mäusen der CKD 4-5-Gruppe.

Sowohl bei den CKD 4-5-Tieren als auch bei den AKI-Tieren konnte im Urin an Tag 10 qualitativ 25-Hydroxy-Vitamin D und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D nachgewiesen werden.

3.1.4 Weitere Parameter

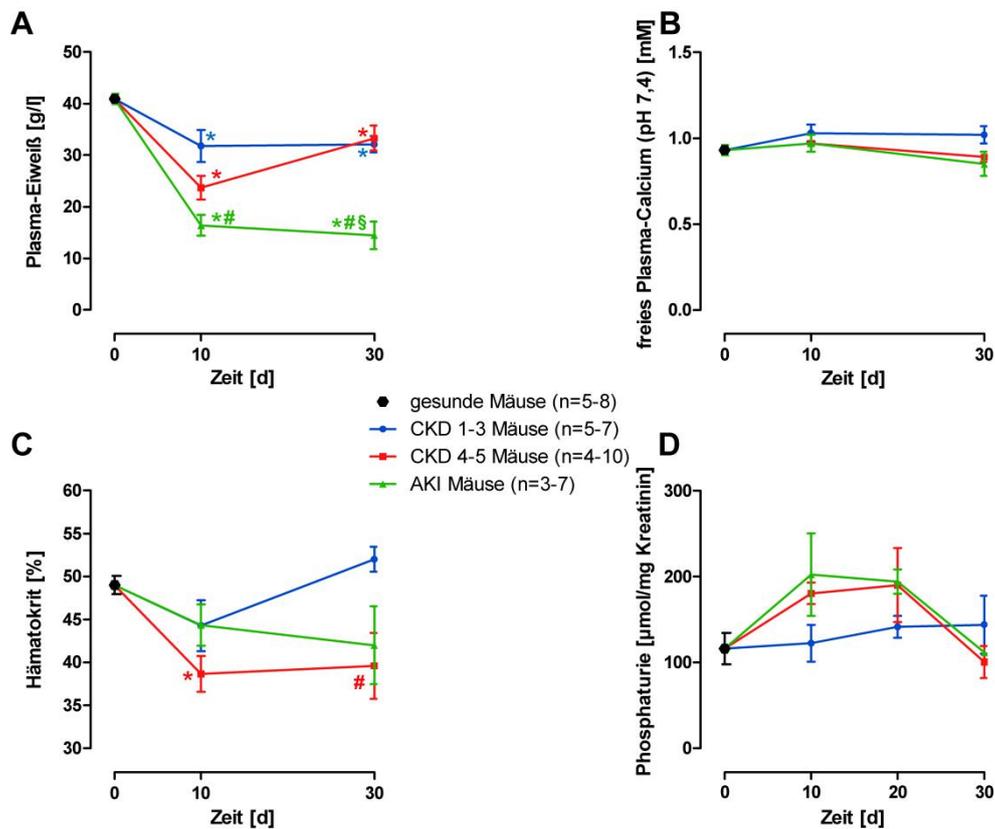


Abb. 3.6: Verlauf weiterer Parameter, publiziert in [100]

Dargestellt ist der Verlauf folgender Parameter jeweils als Mittelwert ± SEM: Plasma-Eiweiß (nach Pyrogallolrot-Methode) in der Einheit g/l (A), freies Plasma-Calcium in der Einheit mM (B), der Hämatokrit in % (C) und die Phosphaturie in der Einheit μmol/mg Kreatinin (D).

*: $p < 0,05$ vs gesunde Tiere; #: $p < 0,05$ vs CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ vs CKD 4-5-Tiere

Bereits an Tag 10 zeigte sich hinsichtlich des mit der Pyrogallolrot-Methode bestimmten Plasma-Eiweißes ein signifikanter Abfall auf ca. 78% des Ausgangswertes von 41 ± 1 g/l bei den CKD 1-3-Mäusen, auf ca. 58% bei den CKD 4-5-Mäusen und auf ca. 40% bei den AKI-Mäusen. Im Verlauf bis Tag 30 kam es lediglich bei den CKD 4-5-Mäusen zu einem Anstieg auf 33 ± 2 g/l, wohingegen es bei den CKD 1-3-Mäusen wie auch bei den AKI-Mäusen zu keiner wesentlichen Veränderung im Vergleich zu Tag 10 kam. Die Werte lagen hier bei 32 ± 2 g/l bzw. bei 14 ± 3 g/l.

Das freie Calcium zeigte nur eine geringe, nicht signifikante Dynamik. Bei

den CKD 1-3-Mäusen kam es an Tag 10 zu einem Anstieg auf das ca. 1,11-fache des Ausgangswertes von $0,93 \pm 0,03$ mM, der mit Werten von $1,02 \pm 0,05$ mM an Tag 30 konstant blieb. Bei den CKD 4-5 – und den AKI-Tieren kam es nach einem geringen Anstieg auf jeweils $0,97 \pm 0,05$ mM zu einem nicht signifikanten Abfall auf $0,89 \pm 0,03$ mM bzw. $0,85 \pm 0,07$ mM.

Der Hämatokrit zeigte nicht signifikant die Entstehung einer Anämie, wobei bei den CKD 1-3-Tieren über 30 Tage keine Anämie nachgewiesen werden konnte. Die CKD 4-5-Tiere zeigten bereits an Tag 10 einen signifikanten Abfall auf ca. 79% des Ausgangswertes von $49,0 \pm 1,1\%$. Dieser Wert blieb im Verlauf über 30 Tage nahezu unverändert. Die AKI-Mäuse zeigten an Tag 10 vergleichbar mit den CKD 1-3-Mäusen einen nicht signifikanten Abfall, wobei es im Verlauf über 30 Tage, anders als bei den CKD 1-3-Tieren, zu einem weiteren nicht signifikanten Abfall des Hämatokrits auf $42,0 \pm 4,5\%$ kam.

Bei den CKD 1-3-Tieren kam es hinsichtlich der Phosphatausscheidung über den Urin zu einem kontinuierlichen, nicht signifikanten Anstieg der Phosphatausscheidung bis Tag 30 auf ungefähr das 1,2-fache des Ausgangswertes von 116 ± 18 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin. Die CKD 4-5-Tiere wie auch die AKI-Tiere zeigten zwischen Tag 10 und Tag 20 einen Anstieg der Phosphaturie auf das etwa 1,6-fache bzw. das etwa 1,7-fache des Ausgangswertes, um dann bis Tag 30 auf eine Phosphaturie von 101 ± 19 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin bzw. 112 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Kreatinin zu fallen.

3.1.5 Gewebeanalytik

3.1.5.1 RTQ-PCR

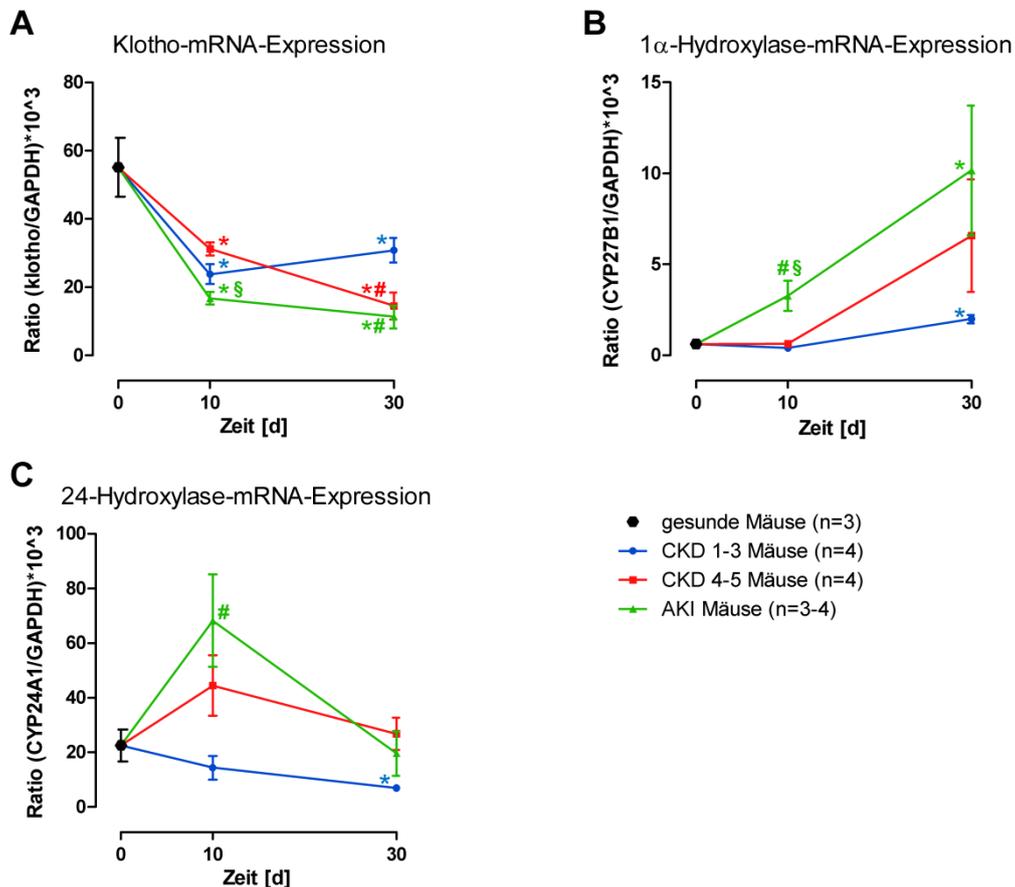


Abb. 3.7: Genexpression im Verlauf über 30 Tage, publiziert in [100]

Dargestellt ist jeweils das Verhältnis zwischen dem jeweils untersuchten Gen und dem housekeeping gene GAPDH. A: Klotho/GAPDH Ratio; B: CYP27B1/GAPDH Ratio; C: CYP24A1/GAPDH Ratio

*: $p < 0,05$ vs gesunde Tiere; #: $p < 0,05$ vs CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ vs CKD 4-5-Tiere

Die Genexpression von Klotho verhielt sich nahezu umgekehrt proportional zum FGF-23-Verlauf. Bei den CKD 1-3-Mäusen kam es an Tag 10 zu einem Abfall der Genexpression auf ca. 43% des Ausgangswertes, gefolgt von einem leichten Anstieg auf $30,8 \cdot 10^3 \pm 3,6 \cdot 10^3$ Kopien, was ungefähr 56% des Ausgangswertes entspricht. Bei den CKD 4-5-Mäusen wie auch bei den AKI-Mäusen zeigte sich ein kontinuierliche Verringerung der Genexpression

auf etwa 26% bzw. etwa 20% des Ausgangswertes von $55,1 \cdot 10^3 \pm 8,6 \cdot 10^3$ Kopien.

Die 1 α -Hydroxylase verhielt sich ebenfalls nahezu umgekehrt proportional zur 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration. Die CKD 1-3-Mäuse zeigten ab Tag 10 einen leichten Anstieg der 1 α -Hydroxylase-Expression auf $2,0 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$ Kopien, das ungefähr 3,2-fache des Ausgangswertes. Ebenfalls ab Tag 10 zeigten die CKD 4-5-Mäuse einen etwas stärkeren Anstieg der Genexpression auf $6,6 \cdot 10^3 \pm 3,1 \cdot 10^3$ Kopien, das etwa 10,7-fache des Ausgangswertes. Bei den AKI-Mäusen zeigte sich über 30 Tage eine kontinuierlich gesteigerte Genexpression, bis auf Werte von $10,2 \cdot 10^3 \pm 3,6 \cdot 10^3$ Kopien.

Die 24-Hydroxylase zeigte bei den CKD 1-3-Mäusen eine abnehmende Aktivität und fiel über 30 Tage auf etwa 31% des Ausgangswertes von $22,6 \cdot 10^3 \pm 5,9 \cdot 10^3$ Kopien. Die CKD 4-5-Mäuse zeigten wie die AKI-Mäuse an Tag 10 einen Spitzenwert in der 24-Hydroxylaseaktivität von $44,4 \cdot 10^3 \pm 11,0 \cdot 10^3$ Kopien bzw. $68,2 \cdot 10^3 \pm 16,9 \cdot 10^3$ Kopien, um anschließend bis Tag 30 auf ca. 118% bzw. 87% des Ausgangswertes zu fallen.

3.1.5.2 Histologie

Histologisch zeigte sich in allen untersuchten Nieren das Bild einer fokal segmentalen Glomerulosklerose unabhängig von der Verlaufsform. Verkalkungen ließen sich in den untersuchten Nieren nicht nachweisen.

Die untersuchten Aorten zeigten, unabhängig von der Verlaufsform unter von-Kossa-Silberfärbung keine Verkalkungen.

Die GSI-Scores wie auch die TSI-Scores der unbehandelten CKD 1-3-Mäuse waren signifikant geringer als die entsprechenden Scores der CKD 4-5-Tiere.

3.1.6 Korrelationen

Eine Tabelle mit den Korrelationen der wichtigsten bestimmten Parameter befindet sich im Anhang. Hervorgehoben werden sollen hier nun einige

auffallende Korrelationen.

Der GSI zeigte eine hoch signifikante Korrelation mit der Nierenfunktion, beispielsweise in Form des Plasma-Phosphates (Pearson Korrelationskoeffizienten $r = 0,66$; $r^2 = 0,43$; $p = 0,04$) oder des Plasma-Harnstoffes ($r = 0,80$; $r^2 = 0,64$; $p = 0,006$). Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter, negativer Zusammenhang mit dem Plasma Proteingehalt ($r = -0,66$; $r^2 = 0,43$; $p = 0,04$). Dieser korrelierte wiederum negativ mit der Proteinurie an Tag 10 ($r = -0,58$; $r^2 = 0,33$; $p < 0,0001$). Eine weitere hochsignifikante Korrelation zeigte sich zwischen den Nierenfunktionsparametern und den logarithmierten FGF23-Spiegeln, beispielsweise sei die Korrelation zwischen dem Logarithmus des FGF23-Spiegels und Phosphat genannt ($r = 0,77$; $r^2 = 0,59$; $p < 0,0001$).

Die logarithmierten Vitaminspiegel von Calcidiol und Calcitriol zeigten eine sehr hohe Korrelation mit dem Plasma Eiweiß ($r = 0,42$; $r^2 = 0,17$; $p = 0,0043$ bzw. $r = 0,68$; $r^2 = 0,46$; $p < 0,0001$), sowie eine signifikante negative Korrelation mit dem Logarithmus des FGF23-Spiegels ($r = -0,38$; $r^2 = 0,15$; $p = 0,01$ bzw. $r = -0,54$; $r^2 = 0,29$; $p = 0,0002$). Darüber hinaus zeigte der Logarithmus des 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegels einen hoch signifikanten Zusammenhang mit dem Logarithmus des 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegels ($r = 0,65$; $r^2 = 0,42$; $p < 0,0001$).

Die Ratio (Klotho/GAPDH)·10³ erwies sich als stark negativ mit dem Logarithmus des FGF23-Spiegels korrelierend ($r = -0,66$; $r^2 = 0,43$; $p = 0,0003$). Die Ratio (Klotho/GAPDH)·10³ zeigte mit der Ratio (CYP27B1/GAPDH)·10³ eine signifikante, negative Korrelation ($r = -0,60$; $r^2 = 0,36$; $p = 0,002$). Ebenfalls einen hoch signifikanten, negativen Zusammenhang zeigte die Ratio (CYP27B1/GAPDH)·10³ mit dem freien Calcium ($r = -0,70$; $r^2 = 0,50$; $p = 0,0001$).

Auffallend war außerdem die geringe Korrelation zwischen den gemessenen PTH-Werten und den anderen ermittelten Parametern, wohingegen die FGF23-Werte zu zahlreichen Parametern eine hohe Korrelation zeigten.

3.1.7 Zusammenfassung – Entwicklung und Verlauf des SHPT

In den Untersuchungen zeigte sich die unterschiedlich schnelle und unterschiedlich ausgeprägte Entwicklung einer proteinurischen Niereninsuffizienz mit Harnstoffanstieg, Kalium- und Phosphatretention und einem konsekutiven PTH-Anstieg. Zwei der drei auftretenden Verlaufsformen zeigten bei der Entwicklung der Niereninsuffizienz deutliche Symptome eines nephrotischen Syndroms. Der PTH-Anstieg, welcher bei zwei Verlaufsformen als SHPT gewertet werden konnte, ging bei allen Verlaufsformen mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten FGF23-Anstieg sowie mit mäßigem bis sehr starkem Abfall sowohl des Calcidiol- wie auch des Calcitriol-Spiegels einher. Konträr hierzu zeigten sich bei den Gewebeparametern eine abnehmende Klotho-Expression sowie eine verstärkte 1 α -Hydroxylaseaktivität. Bei der 24-Hydroxylaseaktivität zeigte sich lediglich bei einer Form ein signifikanter Abfall, wohingegen es bei den anderen beiden Verlaufsformen über 30 Tage zu keiner signifikanten Veränderung kam.

3.2 Therapie des SHPT

Im Therapieteil der Studie wurde versucht, den durch eine chronische Niereninsuffizienz verursachten SHPT mittels phosphatarmer Diät oder Behandlung mit Calcidiol bzw. mit Calcitriol präemptiv zu therapieren. Hierzu wurden nur die Tiere mit der CKD 1-3 - bzw. CKD 4-5 - Verlaufsform herangezogen, die Tiere der AKI - Verlaufsform wurden aufgrund der akuten Niereninsuffizienz und des sich nur milde entwickelnden SHPT (s.o.) nicht beachtet.

3.2.1 Nierenfunktion

Als unbehandelt wird hier die Tierpopulation beschrieben, die zur Verlaufsuntersuchung (s. oben) verwendet wurde und keiner therapeutischen Intervention unterlag. Diese Tiere wurden als Kontrollpopulation für den Therapieeffekt herangezogen.

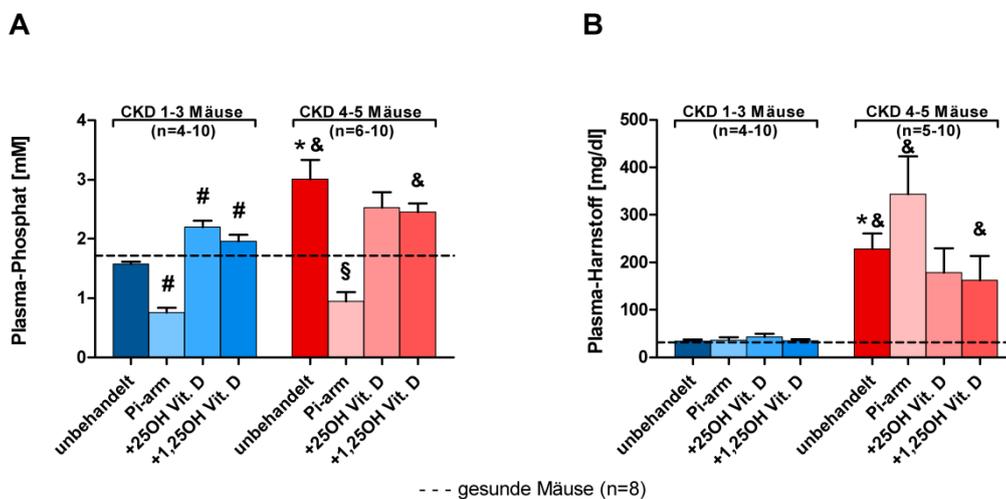


Abb. 3.8: Vergleich der Nierenfunktion nach 30 Tagen unter verschiedenen Therapieansätzen, publiziert in [100]

Unter A dargestellt die jeweiligen Plasmaphosphat-Werte in der Einheit mM unter verschiedenen Therapieregimen. Unter B die entsprechenden Plasmaharnstoffwerte in der Einheit mg/dl.

Die CKD 1-3-Tiere sind jeweils in einem Blauton, die CKD 4-5-Tiere in einem Rotton dargestellt.

*: $p < 0,05$ gesunde vs unbehandelte Tiere; #: $p < 0,05$ unbehandelte CKD1-3- vs behandelte CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ unbehandelte CKD 4-5- vs behandelte CKD 4-5-Tiere; &: $p < 0,05$ zwischen korrespondierenden CKD 1-3- und CKD 4-5-Tieren.

Die mit phosphatarmer Diät behandelten Tiere zeigten sowohl in der CKD 1-3 - also auch in der CKD 4-5 - Verlaufsform einen signifikanten Abfall der Plasmaphosphat-Werte auf $0,8 \pm 0,1$ mM bzw. $1,0 \pm 0,2$ mM, was gegenüber den unbehandelten Tieren einem Abfall auf ca. 48% bzw. ca. 32% entspricht. Die Harnstoffwerte waren mit 36 ± 6 mg/dl bei den CKD 1-3-Tieren bzw. 343 ± 80 mg/dl bei den CKD 4-5-Tieren nicht signifikant verändert.

Die mit Calcidiol behandelten Mäuse zeigten wie die mit Calcitriol behandelten Tiere in der CKD 1-3-Verlaufsform einen signifikanten Anstieg des Phosphatwertes auf das etwa 1,4-fache bzw. das etwa 1,2-fache des Vergleichswertes, der bei den unbehandelten Tieren bei $1,58 \pm 0,04$ mM lag. Hinsichtlich des Harnstoffes zeigten diese Tiere mit 43 ± 7 mg/dl bzw. 35 ± 3 mg/dl keine signifikante Veränderung zu den unbehandelten Vergleichstieren.

Die Tiere der CKD 4-5-Verlaufsform zeigten mit $2,5 \pm 0,3$ mM bzw. $2,5 \pm 0,2$ mM weder bei den Phosphatwerten noch mit 178 ± 51 mg/dl bzw. 162 ± 51 mg/dl bei den Harnstoffwerten eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

3.2.2 Endokrinologische Therapieauswirkungen

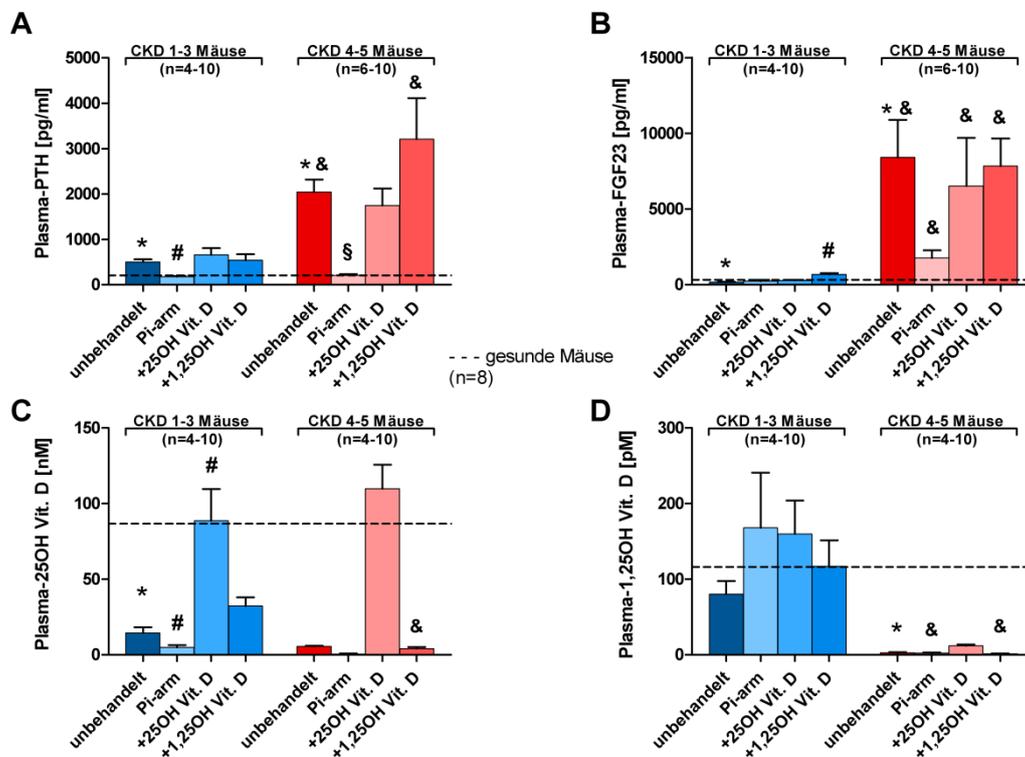


Abb. 3.9: Endokrinologische Wirkung der verschiedenen Therapien nach 30 Tagen, publiziert in [100]

Dargestellt sind die Plasma-PTH-Werte in der Einheit pg/ml (A), die Plasma-FGF23-Werte in der Einheit pg/ml (B), die Plasma-25-Hydroxy-Vitamin D-Werte in der Einheit nM (C) und die 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Werte in der Einheit pM (D).

Die CKD 1-3-Tiere sind jeweils in einem Blauton, die CKD 4-5-Tiere in einem Rotton dargestellt.

*: $p < 0,05$ gesunde vs unbehandelte Tiere; #: $p < 0,05$ unbehandelte CKD 1-3- vs behandelte CKD 1-3-Tiere; §: $p < 0,05$ unbehandelte CKD 4-5- vs behandelte CKD 4-5-Tiere; &: $p < 0,05$ zwischen korrespondierenden CKD 1-3- und CKD 4-5-Tieren.

Hinsichtlich des Plasma-PTH zeigten die mit phosphatarmer Diät behandelten Tiere einen deutlichen Abfall gegenüber den Kontrolltieren auf 172 ± 18 pg/ml bei den CKD 1-3-Tieren bzw. auf 205 ± 27 pg/ml bei den CKD 4-5-Tieren und wiesen mit den gesunden Tieren – 203 ± 27 pg/ml – vergleichbare PTH-Werte auf. Die mit phosphatarmer Diät behandelten Tiere wiesen nach 30 Tagen also weder in der CKD 1-3- noch in der CKD 4-5-Verlaufsform einen SHPT auf. Die mit 25-Hydroxy-Vitamin D wie auch die mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D behandelten Tiere entwickelten sowohl in der CKD 1-3- als auch in der CKD 4-5-Verlaufsform einen mit den Kontrolltieren

vergleichbaren SHPT. Die Plasma-PTH-Werte waren hierbei bei den mit 25-Hydroxy-Vitamin D behandelten Tieren - 661 ± 151 pg/ml bei den CKD 1-3-Mäusen und 1746 ± 372 pg/ml bei den CKD 4-5-Mäusen - wie auch bei den mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D behandelten Tieren - 537 ± 130 pg/ml bei den CKD 1-3-Mäusen und 3204 ± 911 pg/ml bei den CKD 4-5-Mäusen - nicht signifikant different zu den Kontrollwerten von 497 ± 62 pg/ml bei den CKD 1-3-Mäusen und 2045 ± 272 pg/ml bei den CKD 4-5-Mäusen.

Beim Plasma-FGF23 zeigten die CKD 1-3-Tiere unter phosphatarmer Diät sowie diejenigen unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie FGF23-Werte, die sich mit 240 ± 72 pg/ml bzw. 294 ± 24 pg/ml von den FGF23-Werten der gesunden Tiere (311 ± 42 pg/ml) nicht wesentlich unterschieden. Gegenüber den Kontrollwerten der unbehandelten Tiere (172 ± 32 pg/ml) zeigte sich hingegen ein nicht signifikanter Anstieg auf das 1,4-fache bei den Tieren unter phosphatarmer Diät bzw. auf das 1,7-fache bei den Tieren unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie. Die mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D therapierten CKD 1-3-Tiere zeigten gegenüber den Kontrollwerten der unbehandelten Tiere einen deutlichen Anstieg auf 664 ± 91 pg/ml, das 3,9-fache. Bei den CKD 4-5-Mäusen zeigten die Tiere unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie wie auch die Tiere unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie mit FGF23-Werten von 6528 ± 3162 pg/ml bzw. 7849 ± 1803 pg/ml im Vergleich zu den FGF23-Werten der unbehandelten CKD 4-5-Tieren keinen Unterschied. Die CKD 4-5-Tiere unter phosphatarmer Diät zeigten demgegenüber FGF23-Werte im Plasma, die mit 1755 ± 514 pg/ml bei etwa 21% der Kontrollwerte von 8402 ± 2487 pg/ml lagen.

Die Tiere unter phosphatarmer Diät zeigten sowohl in der CKD 1-3-Verlaufsform als auch in der CKD 4-5-Verlaufsform einen Abfall des Calcidiol-Spiegels. Die bestimmten Calcidiol-Spiegel von $4,9 \pm 1,4$ nM bei den CKD 1-3-Tieren bzw. von $0,6 \pm 0,4$ nM bei den CKD 4-5-Tieren entsprachen etwa 34% bzw. 11% des Kontrollwertes von 15 ± 4 nM bzw. $5,4 \pm 0,5$ nM. Unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie kam es bei den CKD 1-3-

Tieren wie auch bei den CKD 4-5-Tieren zu einem signifikanten Anstieg des Plasma-Calcidiol-Spiegels auf physiologische Werte von 89 ± 21 nM bzw. 110 ± 16 nM (Calcidiol bei den gesunden Tieren: 87 ± 4 nM). Die Behandlung mit Calcitriol führte bei den CKD 1-3-Tieren hinsichtlich der 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel ebenfalls zu einem Anstieg, allerdings fiel dieser mit einem Anstieg auf 32 ± 6 nM, das etwa 2,2-fache des Kontrollwertes, geringer aus. Bei den CKD 4-5-Tieren unter Calcitriol-Therapie zeigte sich mit einem Calcidiol-Spiegel von $4,2 \pm 1,0$ nM keine wesentliche Änderung gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren.

Hinsichtlich des Plasma-Calcitriol kam es bei den CKD 1-3-Tieren sowohl unter phosphatarmer Diät wie auch unter Calcidiol- bzw. Calcitriol-Therapie zu einem Anstieg. Die Werte lagen mit 168 ± 73 pM, 160 ± 44 pM bzw. 117 ± 34 pM über dem Kontrollwert der unbehandelten CKD 1-3-Tiere von 80 ± 17 pM. Verglichen mit dem Calcitriol-Spiegel der gesunden Tiere, der bei 116 ± 9 pM lag, wurden bei den CKD 1-3-Tieren unter phosphatarmer Diät wie auch bei den CKD 1-3-Tieren unter Calcidiol-Therapie supraphysiologische Werte erreicht. Die CKD 1-3-Tiere unter Calcitriol-Therapie erreichten Calcitriol-Spiegel, die mit denen der gesunden Tiere vergleichbar waren. Bei den CKD 4-5-Tieren waren die Plasma-Calcitriol-Spiegel mit $2,1 \pm 1,2$ pM unter phosphatarmer Diät bzw. mit $1,4 \pm 0,4$ pM unter Calcitriol-Therapie vergleichbar zu den Kontrollwerten der unbehandelten Tiere ($2,6 \pm 1,0$ pM). Die mit 25-Hydroxy-Vitamin D behandelten CKD 4-5-Tiere zeigten hingegen mit $12,1 \pm 1,7$ pM um das 4,7-fache höhere Werte als die unbehandelten Kontrolltiere.

3.2.3 Gewebeanalytik

3.2.3.1 RTQ-PCR

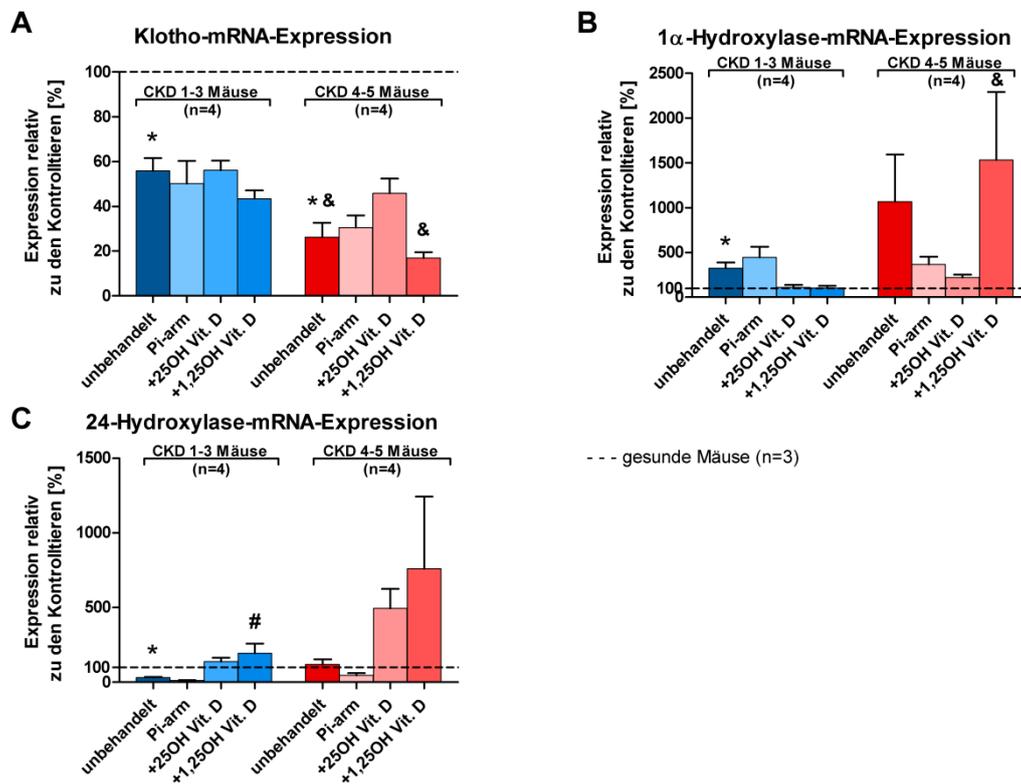


Abb. 3.10: Veränderung der Genexpression unter Therapie nach 30 Tagen, publiziert in [100]

Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der Genexpression zur gesunden Mauspopulation in % für folgende Gene: Klotho (A), CYP27B1 (B) und CYP24A1 (C).

Ad (A): Die gestrichelte Linie zeigt die 100 % der unbehandelten Tiere. Bei den CKD 1-3-Tieren entspricht dies einer Ratio $(\text{Klotho}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $31,88 \pm 3,285$ und bei den CKD 4-5-Tieren einer Ratio $(\text{Klotho}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $13,993 \pm 3,425$.

Ad (B): Die gestrichelte Linie zeigt die 100 % der unbehandelten Tiere. Bei den CKD 1-3-Tieren entspricht dies einer Ratio $(\text{CYP27B1}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $1,838 \pm 0,366$ und bei den CKD 4-5-Tieren einer Ratio $(\text{CYP27B1}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $3,782 \pm 1,865$.

Ad (C): Die gestrichelte Linie zeigt die 100 % der unbehandelten Tiere. Bei den CKD 1-3-Tieren entspricht dies einer Ratio $(\text{CYP24A1}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $11,537 \pm 1,905$ und bei den CKD 4-5-Tieren einer Ratio $(\text{CYP24A1}/\text{GAPDH}) \cdot 10^3$ von $15,703 \pm 4,619$.

Die CKD 1-3-Tiere sind jeweils in einem Blauton, die CKD 4-5-Tiere in einem Rotton dargestellt.

*: $p < 0,05$ gesunde vs unbehandelte Tiere; #: $p < 0,05$ unbehandelte CKD1-3- vs behandelte CKD 1-3-Tiere; &: $p < 0,05$ zwischen korrespondierenden CKD 1-3- und CKD 4-5-Tieren.

Bei den CKD 1-3-Mäusen kam es unter phosphatarmer Diät zu einem Abfall der Klotho-Expression auf 90 ± 18 % des Kontrollwertes der unbehandelten Tiere. Bei den mit 25-Hydroxy-Vitamin D behandelten Tieren kam es zu keiner Änderung der Klotho Expression, wohingegen es unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie zu einem Abfall auf 78 ± 7 % des Kontrollwertes der unbehandelten Tiere, der bei einer Ratio (Klotho/GAPDH)· 10^3 von $31,88 \pm 3,285$ lag, kam. Die mit Calcitriol behandelten Tieren zeigten auch in der CKD 4-5-Verlaufsform einen Abfall der Klotho-Expression in der Niere auf $64,697 \pm 9,921$ % des Kontrollwertes der unbehandelten CKD 4-5-Tiere, der bei einer Ratio (Klotho/GAPDH)· 10^3 von $13,993 \pm 3,425$ lag. Bei den mit phosphatarmer Diät behandelten CKD 4-5-Tieren kam es wie bei den CKD 4-5-Tieren unter Calcidiol-Therapie zu einem Anstieg der Klotho-Expression auf $115,986 \pm 20,904$ % bzw. $174,325 \pm 25,273$ % des Kontrollwertes der unbehandelten CKD 4-5-Tiere.

Hinsichtlich der 1α -Hydroxylase-Expression kam es bei den CKD 1-3-Mäusen unter phosphatarmer Diät zu einem Anstieg auf $137,828 \pm 36,492$ %, bei den Mäusen unter Calcidiol-Therapie zu einem Abfall auf $33,481 \pm 8,784$ % und bei denjenigen unter Calcitriol-Therapie zu einem Abfall der 1α -Hydroxylase-Expression auf $31,711 \pm 7,057$ % des Kontrollwertes der unbehandelten CKD 1-3-Tiere, der bei einer Ratio (CYP27B1/GAPDH)· 10^3 von $1,838 \pm 0,366$ lag. Die CKD 4-5-Tiere zeigten unter phosphatarmer Diät einen Abfall der 1α -Hydroxylase-Expression auf $34,305 \pm 8,098$ % des Kontrollwertes. Die CKD 4-5-Tiere unter 25-Hydroxy-Vitamin D fielen hinsichtlich der 1α -Hydroxylase-Expression in ihren Nieren auf $20,356 \pm 3,377$ % des Kontrollwertes, wobei es unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie zu einem Anstieg auf $143,446 \pm 71,128$ % des Kontrollwertes der unbehandelten CKD 4-5-Tiere - Ratio (CYP27B1/GAPDH)· 10^3 $3,782 \pm 1,865$ - kam.

Die 24-Hydroxylase-Expression fiel sowohl bei den CKD 1-3-Tieren als auch bei den CKD 4-5-Tieren unter phosphatarmer Diät auf $40,145 \pm 8,962$ %

bzw. $38,755 \pm 12,797$ % des jeweiligen Kontrollwertes, der bei den unbehandelten CKD 1-3-Tieren bei einer Ratio (CYP24A1/GAPDH)· 10^3 von $11,537 \pm 1,905$ und bei den unbehandelten CKD 4-5-Tieren bei einer Ratio (CYP24A1/GAPDH)· 10^3 von $15,703 \pm 4,619$ lag. Zu einem Anstieg der 24-Hydroxylase-Expression kam es bei den CKD 1-3-Tieren wie auch bei den CKD 4-5-Tieren sowohl unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie als auch bei den Tieren unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie. Hierbei zeigten sich Anstiege auf $454,459 \pm 83,099$ % bzw. $416,971 \pm 109,527$ % des jeweiligen Kontrollwertes bei den Tieren unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie und auf $631,524 \pm 217,727$ % bzw. $641,959 \pm 406,399$ % des jeweiligen Kontrollwertes bei den Tieren unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie.

3.2.3.2 Histologie

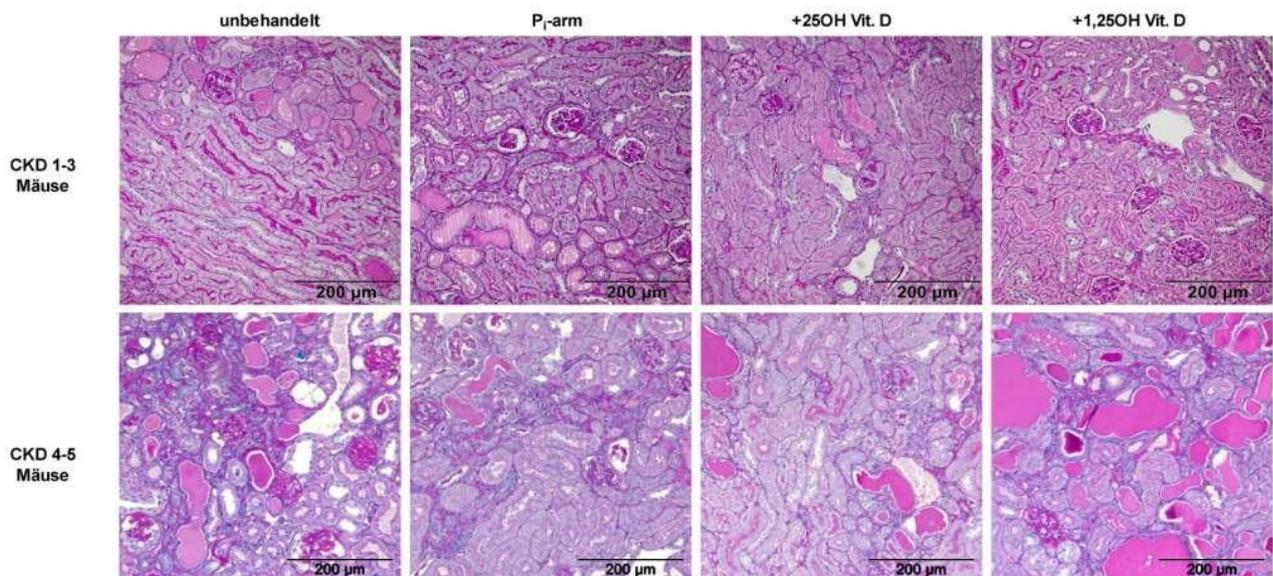


Abb. 3.11: Exemplarische Nierenschnitte nach 30 Tagen Verlauf, publiziert in [100]

Beispielhafte histopathologische Nierenschnitte der verschiedenen Verlaufsformen und Behandlungsformen; PAS-Färbung, 400-fach vergrößert
(Eine vergrößerte Darstellung findet sich auf Seite 96 dieser Arbeit)

Histologisch zeigte sich in allen untersuchten Nieren das Bild einer fokal segmentalen Glomerulosklerose unabhängig von der Therapieform. Verkalkungen ließen sich in den untersuchten Nieren nicht nachweisen. Die untersuchten Aorten zeigten, unabhängig von der Therapieform, unter von-Kossa-Silberfärbung keine Verkalkungen.

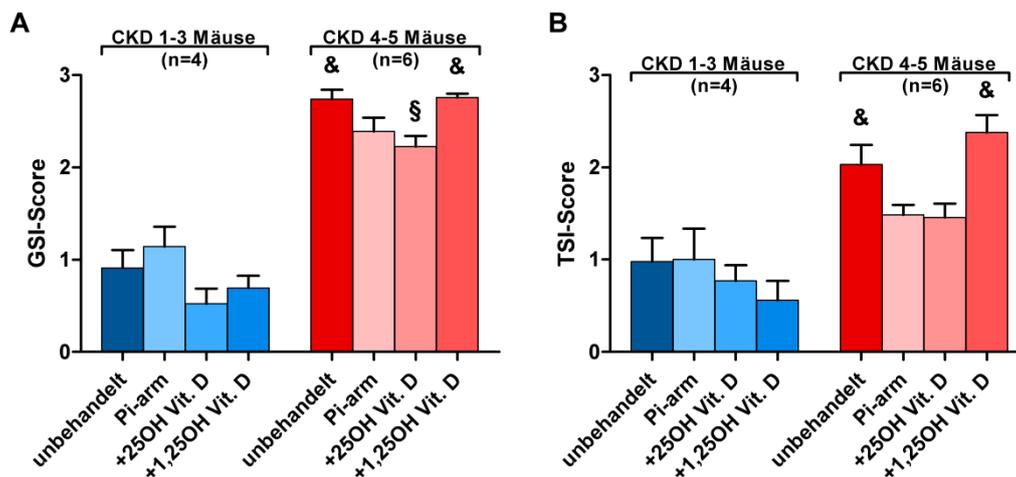


Abb. 3.12: Glomerulärer und tubulärer Nierenschaden, publiziert in [100]

Grafik A zeigt die histopathologisch bestimmten Glomerulosklerose Indices (GSI) der verschiedenen Therapie- und Verlaufsformen. Grafik B zeigt die Tubulointerstitiellen Schädigungsindices (TSI) der jeweiligen Verlaufs- und Therapieformen. Die CKD 1-3-Tiere sind jeweils in einem Blauton, die CKD 4-5-Tiere in einem Rotton dargestellt. §: $p < 0,05$ unbehandelte CKD 4-5- vs behandelte CKD 4-5-Tiere; &: $p < 0,05$ zwischen korrespondierenden CKD 1-3- und CKD 4-5-Tieren.

Unter Behandlung zeigten die CKD 1-3-Mäuse durchweg GSI-Score-Werte, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden. So lag der GSI-Score bei den unbehandelten CKD 1-3-Tieren bei $0,9 \pm 0,2$, bei den CKD 1-3-Tieren unter phosphatarmer Diät bei $1,1 \pm 0,2$, bei den mit Calcidiol behandelten CKD 1-3-Mäusen bei $0,5 \pm 0,2$ und bei den CKD 1-3-Tieren unter Calcitriol-Therapie bei $0,7 \pm 0,1$. Die CKD 4-5-Tiere unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie zeigten mit $2,2 \pm 0,1$ gegenüber den unbehandelten CKD 4-5-Tieren ($2,7 \pm 0,1$) einen signifikant geringeren GSI-Score. Die anderen Behandlungsformen zeigten sich mit $2,4 \pm 0,1$ bei den CKD 4-5-Mäusen unter phosphatarmer Diät und mit $2,76 \pm 0,04$ bei den CKD 4-5-Tieren unter

1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Therapie nicht signifikant different zu den unbehandelten CKD 4-5-Kontrolltieren. Also wiesen, abgesehen von den CKD 4-5-Mäusen unter Calcidiol-Therapie, alle CKD 1-3- bzw. CKD 4-5-Tiere einen jeweils vergleichbaren glomerulären Schaden auf.

Die CKD 1-3-Tiere unter phosphatarmer Diät zeigten mit einem TSI-Score von $1,0 \pm 0,3$ einen nahezu identischen Wert wie die unbehandelten CKD 1-3-Kontrolltiere, deren TSI-Score bei $1,0 \pm 0,3$ lag. Die CKD 1-3-Tiere unter 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie zeigten mit einem TSI-Score von $0,8 \pm 0,2$ wie auch die mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D therapierten Tiere mit einem TSI-Score von $0,6 \pm 0,2$ geringere Scores als die unbehandelten CKD 1-3-Kontrolltiere. Bei den CKD 4-5-Tieren zeigten die Mäuse unter Calcitriol-Therapie mit einem TSI-Score von $2,4 \pm 0,2$ einen etwa 1,2-fachen Score der unbehandelten CKD 4-5-Kontrolltiere, deren TSI-Score bei $2,0 \pm 0,2$ lag. Dem gegenüber zeigten sich, wenn auch nicht signifikant, unter phosphatarmer Diät wie auch unter Calcidiol-Therapie deutlich geringere TSI-Scores, die mit Scores von $1,5 \pm 0,1$ bzw. $1,5 \pm 0,2$ bei etwa 73% bzw. 72% des Kontrollwertes der unbehandelten CKD 4-5-Tiere lagen.

3.2.4 Interventionelle Therapie und Überlebensanalyse

Dieser Teil der Untersuchung wurde auf CKD 4-5-Mäuse beschränkt. Verglichen wurden unbehandelte Tiere mit Tieren unter phosphatarmer Diät. Diese hatte sich als effizienteste Therapie erwiesen und führte zu einer Verringerung der Phosphaturie und zu einer Unterdrückung des SHPT.

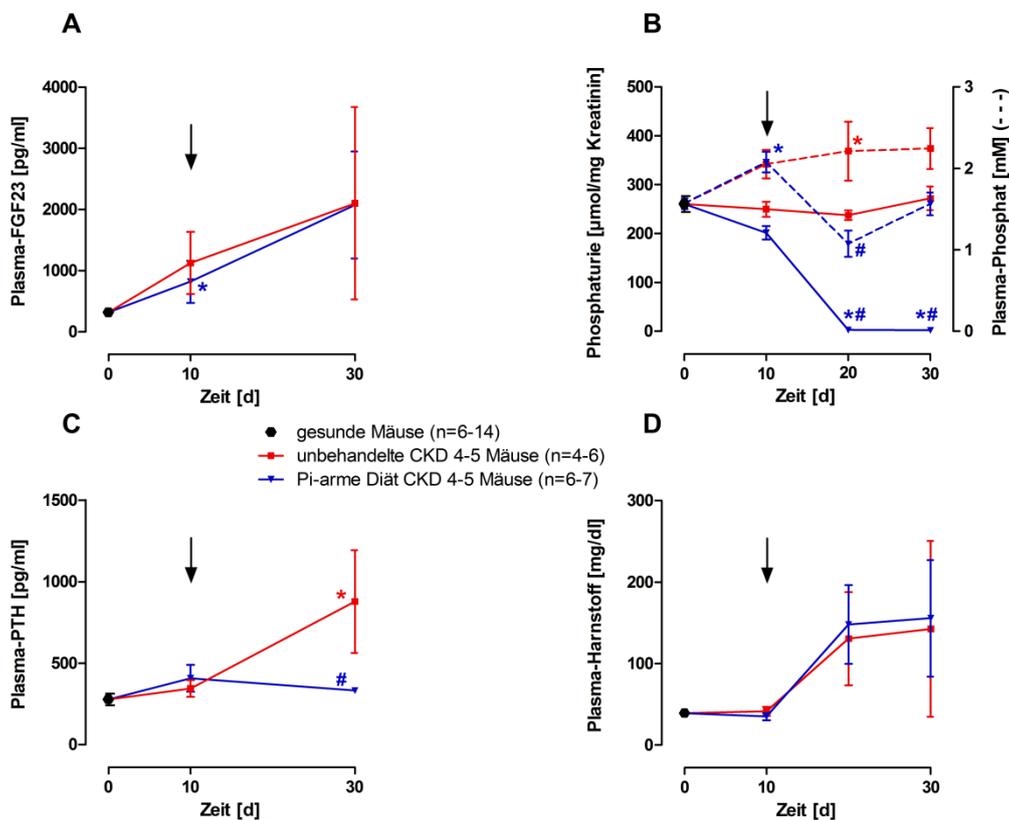


Abb. 3.13: Interventionelle Therapie mit Phosphatrestriktion, publiziert in [100]

Dargestellt sind Plasma-FGF23 in der Einheit pg/ml (A), Phosphaturie in der Einheit $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin und Plasma-Phosphat in der Einheit mM (gestrichelt) (B), Plasma-PTH in der Einheit pg/ml und Plasma-Harnstoff in der Einheit mg/dl (D). Der Pfeil (\downarrow) markiert den Zeitpunkt der Zuteilung der Tiere zum Kontroll- bzw. zum Therapiearm.

*: $p < 0,05$ vs gesunde Tiere; #: $p < 0,05$ unbehandelte vs behandelte Tiere.

Zehn Tage nach Induktion des Krankheitsmodells wurden Tiere der CKD 4-5-Verlaufsform mit erhöhten Plasma-FGF23-Werten einem Kontroll- bzw. einem Therapiearm zugeteilt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die beiden Gruppen sich hinsichtlich ihrer Nierenfunktion nicht signifikant voneinander unterschieden. Im Verlauf über 30 Tage kam es bei den Kontrolltieren wie auch bei den therapierten Tieren zu einem FGF23-Anstieg auf 2098 ± 1573 pg/ml bzw. 2074 ± 872 pg/ml.

Zum Zeitpunkt der Stratifizierung wiesen die Tiere eine milde Hyperphosphatämie auf. Im Verlauf stabilisierte sich die Hyperphosphatämie bei den Kontrolltieren mit einem Wert von zuletzt $2,2 \pm 0,3$ mM. Nach

Therapiestart zeigten die therapierten Tiere an Tag 20 einen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigten Plasmaphosphat-Spiegel von $1,1 \pm 0,2$ mM. Bis Tag 30 stieg bei diesen Tieren der Phosphatspiegel wieder auf einen Wert von $1,6 \pm 0,1$ mM an. Die Phosphaturie war bei den Kontrolltieren mit einem Wert von 272 ± 24 $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin an Tag 30 nur diskret erhöht. Die Tiere im Therapiearm der Untersuchung zeigten hingegen nach Therapiestart einen signifikanten Abfall der Phosphaturie auf einen Wert von zuletzt $2,3 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/mg}$ Kreatinin.

30 Tage nach Induktion hatte sich bei den Kontrolltieren ein SHPT mit Plasma-PTH-Werten von 878 ± 314 pg/ml eingestellt. Die therapierten Tiere wiesen mit 333 ± 6 pg/ml keinen SHPT auf und zeigten signifikant niedrigere PTH-Werte.

Im Verlauf kam es bei beiden Gruppen zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion mit Plasma-Harnstoffwerten von zuletzt 143 ± 108 mg/dl bei den Kontrolltieren und 156 ± 71 mg/dl bei den therapierten Tieren.

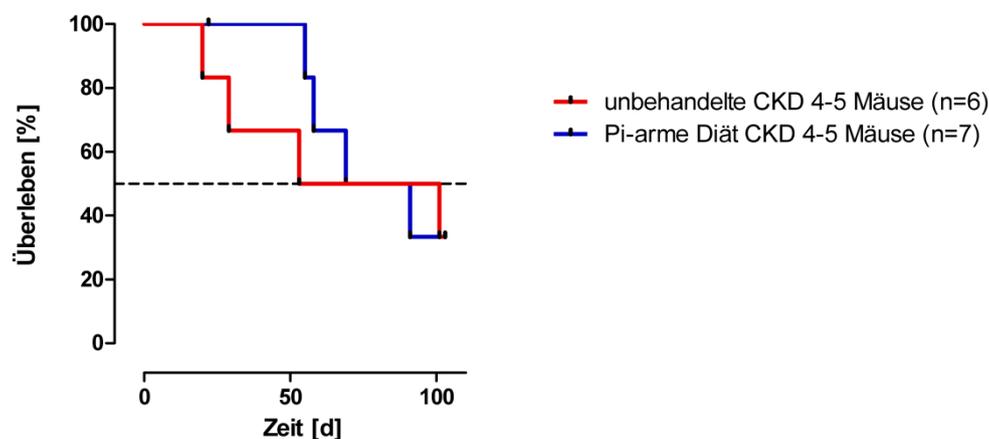


Abb. 3.14: Kaplan-Meier-Kurve über 103 Tage nach Induktion

Ein Vergleich der Überlebenskurven lieferte im Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test mit einem p-Wert von 0,47 kein signifikantes Ergebnis, jedoch zeigte sich vor allem zu Beginn bei den therapierten Tieren eine Tendenz zu längerem Überleben.

Das mediane Überleben war mit 77 Tagen bei den Kontrolltieren und 80 Tagen bei den therapierten Tieren nicht signifikant verschieden.

3.2.5 Zusammenfassung - Therapie des SHPT

Beim Vergleich verschiedener Therapieregime erwies sich die Phosphatrestriktion als dasjenige, das sowohl im präemptiven wie auch im interventionellen Ansatz in der Lage war, die Entwicklung eines SHPT zu unterbinden. Ebenso gelang hierdurch im präemptiven Setting eine Suppression des enormen FGF23-Anstieges. Eine Überwindung der Hypovitaminose gelang lediglich in der CKD 1-3-Verlaufsform, hier jedoch durch alle Therapien. Bei den CKD 4-5-Tieren zeigte lediglich die 25-Hydroxy-Vitamin D-Therapie ansatzweise eine Erhöhung der depletierten Plasma-Calcitriol-Spiegel. Die Klotho-Expression wurde von keiner Therapiestrategie signifikant beeinflusst. Calcidiol und Calcitriol zogen bei allen Verlaufsformen eine Induktion der 24-Hydroxylase nach sich. Bei den CKD 1-3-Tieren waren die 1α -Hydroxylase Spiegel unter phosphatarmer Diät stabil, wohingegen sie unter Substitution mit Calcidiol und Calcitriol sanken. Bei den CKD 4-5-Tieren führte die Therapie mit Calcitriol zu einer Steigerung der 1α -Hydroxylase Expression, die anderen Therapien verursachten einen Abfall der Expression. Bei den histologisch ermittelten TSI-Scores zeigten die CKD 4-5-Tiere unter phosphatarmer Diät trotz vergleichbarer glomerulärer Schädigung deutlich, wenn auch nicht signifikant, geringere Werte. Diese Tiere zeigten ebenfalls eine Tendenz zu längerem Überleben, vor allem in der Anfangsphase der Untersuchung, was sich allerdings nicht in einer signifikanten Veränderung des mittleren Überlebens niederschlug.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, anhand eines proteinurischen Mausmodelles eine optimale Strategie zur Behandlung und Unterdrückung des SHPT zu finden. Dies geschah durch eine Verlaufsbeobachtung des SHPT und durch die Untersuchung verschiedener Therapiestrategien mit Phosphatrestriktion und Vitamin D-Substitution.

4.1 Entwicklung und Verlauf des SHPT

Abhängig von der injizierten Doxorubicin-Dosis war es gelungen drei unterschiedliche Verläufe der Niereninsuffizienz zu generieren: eine akute Niereninsuffizienz (AKI-Tiere) und zwei Formen einer proteinurischen chronischen Niereninsuffizienz, einmal mit nahezu erhaltener GFR (CKD 1-3-Tiere) und eine fortgeschrittenere Form (CKD 4-5-Tiere). Alle Tiere zeigten eine Proteinurie, wobei diese bei den AKI-Tieren am ausgeprägtesten und bei den CKD 1-3-Tieren am wenigsten ausgeprägt war. Parallel hierzu entwickelten die Tiere eine, dem Ausmaß der Proteinurie entsprechende, Hypoproteinämie. Zehn Tage nach Induktion hatten die AKI-Tiere und in geringerem Ausmaß auch die CKD 4-5-Tiere eine massive Hyperphosphatämie entwickelt, welche über den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen bestand. Bei diesen Tieren zeigte sich analog eine erhöhte Phosphaturie, welche ab Tag 20 einbrach. Das freie Calcium war bei allen Verlaufsformen nahezu konstant, wobei sich bei den AKI-Tieren wie auch bei den CKD 4-5-Tieren eine leichte Tendenz hin zu einer Hypocalciämie andeutete.

Die CKD 1-3-Tiere wie auch die CKD 4-5-Tiere entwickelten einen SHPT, der bei ersteren eher mild, bei letzteren sehr deutlich ausgeprägt war. Bei den AKI-Tieren zeigten sich kein SHPT. Mit dem FGF23 verhielt es sich genau umgekehrt, hier zeigten die AKI-Tiere einen massiven Anstieg, der bei den

CKD 4-5-Tieren weniger stark ausfiel und bei den CKD 1-3-Tieren nicht nachzuweisen war. Zehn Tage nach Beginn der Proteinurie zeigten sowohl die AKI-Tiere als auch die CKD 4-5-Tiere einen massiven Abfall ihrer Calcidiol- wie auch Calcitriol-Spiegel. Bei den CKD 1-3-Tieren fiel der Calcidiol-Spiegel langsamer und weniger stark ab und der Calcitriol-Spiegel blieb nahezu stabil.

Die Expression von α -Klotho in der Niere sank in allen Untersuchungsgruppen, wobei die AKI-Tiere und die CKD 4-5-Tiere einen wesentlich stärkeren Abfall nachzuweisen hatten. Die 1α -Hydroxylase Expression stieg bei allen Tieren an, wobei der Anstieg bei den AKI-Tieren an Tag 10 zuerst auftrat. Die 24-Hydroxylase zeigte bei den AKI-Tieren und den CKD 4-5-Tieren an Tag 10 eine erhöhte Expression und sank danach wieder auf Normalwerte ab, bei den CKD 1-3-Tieren sank die 24-Hydroxylase Expression an Tag 30 deutlich weiter ab.

Eine Stärke dieser Studie liegt sicherlich in dem verwendeten Mausmodell, das die Möglichkeit bietet, in weiterführenden Studien durch genetisch veränderte Mäuse erweitert zu werden. Nahezu alle bisherigen Studien zum SHPT verwenden Rattenmodelle. Ein möglicher Grund hierfür mag der Mangel an geeigneten Mausmodellen sein, wohingegen zahlreiche Modelle an Ratten beschrieben sind, zum Beispiel ein Anti-GBM-Antikörper-Modell [64], einem 5/6 Nephrektomie-Modell [85] oder ein Adenin-Diät-Modell [86].

Das verwendete Maus-Modell ist an ein Adriamycin-Rattenmodell, das 1982 erstmals von Bertani et al. beschrieben wurde, angelehnt [87]. Dieses Modell ist jedoch auf bestimmte Mauslinien beschränkt und die am häufigsten genutzte Mauslinie C57BL/6 ist resistent [88].

Neben der Resistenz zahlreicher Mauslinien ist das Abweichen des Modells von der klinischen Praxis eine weitere Einschränkung. Üblicherweise ist der Vitamin D-Mangel bei Patienten nicht durch einen proteinurischen Verlust über den Urin verursacht und eine Therapie des Calcitriol-Mangels ist durch

orale Substitution gut möglich. Es gibt jedoch auch Patienten mit massivem nephrotischem Syndrom, bei denen ein Vitamin D-Mangel durch Verlust über den Urin verursacht wird [66], ebenso wie bei Kindern und Erwachsenen mit Diabetes mellitus Typ 1 [65].

Die drei Verlaufsformen, die sich analog zu den Induktionsdosierungen im Verlauf abgrenzen ließen, wurden in Anlehnung an die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz als CKD 1-3 ähnliche – sowie CKD 4-5 ähnliche Verlaufsform und als akutes Nierenversagen (AKI) benannt [2]. Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, entwickelten die Mäuse nach Schädigung der Podozyten durch Doxorubicin einen proteinurischen Nierenschaden [71, 87, 89]. Dieser Nierenschaden reichte, je nach Ausmaß der Schädigung, von einer erhaltenen bzw. nur leicht reduzierten GFR mit nur geringfügigem Harnstoffanstieg über 30 Tage bei den CKD 1-3-Tieren über eine fortgeschrittenere Schädigung mit deutlichem GFR-Abfall, deutlichem Harnstoffanstieg, Phosphatretention und Entwicklung eines nephrotischen Syndroms mit ödembedingtem Gewichtsanstieg und einer Hyperlipoproteinämie bei den CKD 4-5-Tieren bis zu einer akuten Niereninsuffizienz mit einem abrupten GFR-Verlust, einem massiven Harnstoffanstieg bereits nach zehn Tagen, einer deutlichen Phosphatretention sowie ebenfalls der Entwicklung eines nephrotischen Syndroms bei den AKI-Tieren.

Eine weitere spannende Frage, welche diese Studie zu beantworten versuchte, ist die Frage nach der Abfolge der pathophysiologischen Ereignisse, die schlussendlich in einer CKD-MBD enden. Hierzu ist eine Betrachtung der Nierenfunktionsparameter und vor allem der gemessenen Hormonwerte nötig. Bereits an dieser Stelle drängt sich - ohne Berücksichtigung der Ergebnisse der unterschiedlichen Therapiestrategien - eine vor allem phosphatabhängige Pathogenese des SHPT auf. FGF23

zeigte große Parallelen zum Verlauf der Phosphatspiegel. Über alle Verlaufsformen hinweg gab es eine hohe Korrelation zwischen Plasma-Phosphat und FGF23 ($r=0,77$). Dies legt eine enge Beziehung zwischen Phosphatretention und FGF23 nahe, die auch in anderen Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte [90]. Interessanterweise zeigten die AKI-Mäuse trotz der höchsten Phosphatwerte im Vergleich zu den CKD Tieren keine deutliche Entwicklung eines SHPT. Diese Tatsache lässt sich wohl mit einem inhibitorischen Effekt exzessiv erhöhter FGF23-Spiegel auf die PTH-Sekretion erklären [57, 58]. Der inhibitorische Effekt auf die PTH-Sekretion mag auch, aufgrund der im Vergleich zu den beiden anderen Verlaufsformen veränderten PTH-Dynamik, als Grund für die geringen Korrelationen zwischen den gemessenen PTH-Werten und den anderen ermittelten Parametern angesehen werden.

Weiterhin zeigten die Daten, dass FGF23 vor PTH einen signifikanten Anstieg erreicht. Diese Tatsache lässt sich durch Beobachtungen an Patienten mit geringgradiger CKD [91, 92] und an gentechnisch veränderten Mäusen, die eine Überexpression von FGF23 zeigen [93], untermauern. Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die eine Stimulation der FGF23 Expression durch PTH in vivo und in vitro gezeigt haben [40]. Um diese Beobachtungen in Einklang zu bringen, wäre es denkbar, dass in den frühen Phasen der CKD andere metabolische Veränderungen wie beispielsweise eine Änderung im Verhältnis von Phosphat zu Pyrophosphat die FGF23-Expression triggern. Im weiteren Verlauf der CKD könnte dann PTH die Rolle des vornehmlichen Regulators der FGF23-Expression übernehmen. Ebenso wäre es denkbar, dass kleinste Änderungen des PTH-Spiegels eine Rolle dabei spielen, die Osteozyten für eine Urämie zu sensibilisieren und zur FGF23-Expression anzuregen [36].

Eine weitere Auffälligkeit ergab sich bei Betrachtung der Vitamin D-Spiegel. Hier stellte sich innerhalb kurzer Zeit, bereits zehn Tage nach Induktion, in allen Verlaufsformen ein deutlicher Vitamin D-Mangel ein, wobei bei den

CKD 4-5-Tieren und bei den AKI-Tieren das Plasma nahezu Vitamin D frei war. Angesichts der langen Halbwertszeit von Calcidiol ist diese Tatsache zunächst verwunderlich, lässt sich aber bei einem zweiten Blick am besten dem proteinurischen Modell zuschreiben. Durch die massive Proteinurie vor allem in der CKD 4-5 – und der AKI-Verlaufsform kommt es zu einem Verlust von DBP und anderen Vitamin D bindenden Proteinen. Dies führt parallel zu einem Verlust der Vitamin D-Bindekapazität des Plasmas und dadurch vor allem zu einem Verlust von Calcidiol, das den größten Anteil der im Plasma gebundenen Vitamin D-Metabolite ausmacht. In der Folge fällt auch das Calcitriol, welches eine deutlich kürzere Halbwertszeit als Calcidiol hat und aus diesem synthetisiert wird. Diese Hypothese lässt sich durch den deutlichen Nachweis von Vitamin D im Urin von CKD 4-5 – und AKI-Tieren untermauern. Darüber hinaus sprechen hohe Korrelationen zwischen sowohl Calcidiol ($r=0,42$) als auch Calcitriol ($r=0,68$) und dem Plasma-Eiweiß-Spiegel, der durch die starke Proteinurie beeinflusst ist, für diese Annahme. Trotz deutlich erhöhter FGF23-Werte, die normalerweise die Expression der 1α -Hydroxylase unterdrücken [54], wurde der massive Vitamin D-Mangel von einer kompensatorisch erhöhten Expression der 1α -Hydroxylase begleitet. Dieses Ergebnis könnte durch eine Unterbrechung des negativen Feedbacks von Calcitriol auf die renale 1α -Hydroxylase bei massivem Calcitriol-Mangel, wie er in diesem Modell vorliegt, erklärt werden [94]. Bestätigung erfahren diese Ergebnisse durch andere Tierexperimente mit Vitamin D-defizienten Modellen, die ebenfalls eine erhöhte Expression der renalen 1α -Hydroxylase gezeigt haben [95, 96]. Dem gegenüber stehen Beobachtungen einer älteren Studie, die in Nierenbiopsien von CKD-Patienten erniedrigte 1α -Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen hat [97]. Hinsichtlich der 24 -Hydroxylase muss bedacht werden, dass ihre Aktivierung ebenfalls zu einem Vitamin D-Mangel führen kann [95], was hier aber sicherlich nicht führend zum Tragen kommt. Dies zeigt sich auch durch eine Normalisierung der zwischenzeitlich erhöhten Expression aufgrund des Vitamin D-Mangels.

Ab Tag 10 zeigten alle Tiere eine verminderte Klotho-Expression, die invers mit der Schwere der Nephropathie und des Nierenschadens, repräsentiert durch den GSI und den TSI, korrelierte ($r = -0.82$ bzw. $r = -0,56$). Diese Daten suggerieren einen frühzeitigen Verlust der Klotho-Expression bei CKD, was zu einer FGF23-Resistenz führt und daher eine starke negative Korrelation zwischen FGF23 und Klotho begründet ($r = -0,66$). Bei Dialysepatienten konnte ebenfalls eine verminderte Klotho-Expression bei erhöhten FGF23-Spiegeln nachgewiesen werden [98].

4.2 Therapie des SHPT

Nach der Untersuchung von Entstehung und Verlauf des SHPT wurden in einem zweiten Schritt verschiedene Therapiestrategien geprüft. Untersucht wurde hierbei die Substitution von Calcidiol bzw. Calcitriol zur Kompensation des massiven Vitamin D-Mangels sowie Phosphatrestriktion zur Korrektur der massiven Hyperphosphatämie.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphatrestriktion in der Lage ist, sowohl in der CKD 1-3-Verlaufsform wie auch in der CKD 4-5-Verlaufsform, die Entwicklung eines SHPT zu unterbinden, wohingegen weder die Substitution mit Calcidiol noch die Substitution mit Calcitriol in der Lage waren, die erhöhte PTH-Sekretion zu unterdrücken. Calcidiol war in der Lage bei den CKD 1-3-Tieren wie auch bei den CKD 4-5-Tieren die Calcidiol-Spiegel im Plasma zu normalisieren, was durch keine andere Therapieform gelang. Die Calcitriol-Spiegel blieben bei den CKD 1-3-Tieren unter jeder Therapie normal, wohingegen bei den CKD 4-5-Tieren keine Behandlung in der Lage war, die Calcitriol-Spiegel zu normalisieren. Die Phosphatrestriktion verhinderte sowohl bei den CKD 1-3-Mäusen wie auch bei den CKD 4-5-Mäusen eine Hyperphosphatämie, wohingegen Calcidiol und Calcitriol auch bei den CKD 1-3-Tieren eine Hyperphosphatämie induzierten. Das freie Calcium blieb stabil und zeigte nur bei den CKD 4-5-Tieren unter phosphatarmer Diät eine geringfügige Erhöhung.

Die Klotho-Expression wurde von keiner Therapiestrategie signifikant beeinflusst. Calcidiol und Calcitriol zogen bei allen Verlaufsformen eine Induktion der 24-Hydroxylase nach sich. Bei den CKD 1-3-Tieren waren die 1α -Hydroxylase-Spiegel unter phosphatarmer Diät stabil, wohingegen sie unter Substitution mit Calcidiol bzw. Calcitriol sanken. Bei den CKD 4-5-Tieren führte die Therapie mit Calcitriol zu einer Steigerung der 1α -Hydroxylase-Expression, die anderen Therapien verursachten einen Abfall der Expression.

Die histologischen Untersuchungen zeigten bei den CKD 4-5-Tieren einen gegenüber den CKD 1-3-Tieren deutlich höheren Glomerulosklerose-Index (GSI), der bei den CKD 4-5-Tieren unter Calcidiol-Substitution signifikant geringer war. Der tubuläre Schädigungsindex (TSI) war bei den CKD 4-5-Tieren verglichen mit den CKD 1-3-Tieren ebenfalls erhöht, wobei die Tiere unter phosphatarmer Diät und unter Calcidiol-Substitution deutlich, wenn auch nicht signifikant, niedrigere Scores aufwiesen.

Nachdem die phosphatarmer Diät sich als potenteste Therapie erwiesen hatte und sich zeigte, dass sie in der Lage ist, die Hyperphosphatämie und Phosphaturie zu verringern und die Entwicklung eines SHPT zu verhindern, wurden CKD 4-5-Tiere mit erhöhten FGF23-Werten an Tag 10 in zwei Gruppen unterteilt, um im interventionellen Setting die Therapieeffizienz und die Hypothese eines Nierenschadens durch Phosphaturie [69, 70] zu überprüfen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Tiere eine milde Hyperphosphatämie und Phosphaturie, jedoch keinen SHPT auf. Die phosphatarmer Therapie führte zu einer deutlichen Verringerung der Hyperphosphatämie und der Phosphaturie und verhinderte die Entwicklung eines SHPT, der bei der Kontrollgruppe ohne Therapie auftrat. Die FGF23-Konzentration blieb stabil, die Plasma-Harnstoff-Konzentration als Marker der fortschreitenden Niereninsuffizienz stieg jedoch in beiden Gruppen gleichförmig an. Auch hinsichtlich des Überlebens bei der Nachbeobachtung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, allerdings zeigten die Tiere

unter phosphatarmer Diät eine Tendenz zu längerem Überleben, vor allem in der Anfangsphase des Beobachtungszeitraumes.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Verlaufsuntersuchung konnte durch die Therapiestudien bestätigt werden, dass die treibende Kraft hinter der Entwicklung des SHPT in diesem proteinurischen Mausmodell die Phosphatretention ist. Durch die phosphatarme Diät konnte die Entwicklung eines SHPT in beiden Verlaufsformen suffizient unterbunden werden. Diese Ergebnisse sprechen klar für eine phosphozentrische Sichtweise in der Pathophysiologie des SHPT und legen, wie oben bereits diskutiert, einen engen Zusammenhang zwischen Phosphatretention und FGF23 nahe, der auch in anderen Untersuchungen bereits nachgewiesen wurde [90]. In einer Studie mit dem Phosphatbinder Sevelamer konnte bei Ratten mit Adenin-induzierter CKD ein Rückgang der Phosphat- und FGF23-Spiegel im Plasma nachgewiesen werden, wodurch sich der SHPT verbesserte [86]. Ein Therapiestart mit phosphatarmer Diät 10 Tage nach Induktion bei bereits erhöhten FGF23-Werten unterband die Entwicklung eines SHPT, wohingegen die FGF23-Werte nicht sanken. Dies legt nahe, dass die FGF23-Sekretion in diesem Kontext nicht nur über eine Hyperphosphatämie, sondern auch durch andere Faktoren, wie beispielsweise einen Nierenschaden, unterhalten wird. Dies konnte auch in einer Studie an Patienten mit AKI gezeigt werden, die sehr schnell erhöhte FGF23-Spiegel aufwiesen, ohne dass dies einer reduzierten Clearance zuzuschreiben war [99].

In engem Zusammenhang mit einer phosphatarmen Therapie des SHPT steht auch die Hypothese, die Kuro-o in einem Paper diskutiert und einen Paradigmenwechsel bei der Therapie des CKD-MBD vorschlägt. Als Trigger einer Therapie bei chronischer Niereninsuffizienz in der Prädialyse-Phase schlägt Kuro-o erhöhte FGF23-Konzentrationen vor und zwar mit dem Ziel, weiteren Nierenschaden durch Phosphaturie und die damit verbundene

Bildung von Calciprotein Partikeln (CPP) zu verhindern [69, 70]. Diese These lässt sich mit den histologischen Ergebnissen der Tiere unter phosphatarmer Diät in Einklang bringen. Trotz gleicher GSI-Werte, die eine vergleichbare Schwere der Nierenschädigung durch die Doxorubicin-Induktion belegen, zeigen die CKD 4-5-Mäuse unter phosphatarmer Diät eine deutlich geringere tubuläre Schädigung durch die Proteinurie, repräsentiert durch den TSI. Angesichts des Plasma-Harnstoffs als Marker der fortschreitenden Niereninsuffizienz ergaben sich allerdings keine Vorteile für die Tiere unter phosphatarmer Diät. Demgegenüber zeigt die Überlebensanalyse eine, wenn auch nicht signifikante, Tendenz der phosphatarm therapierten Tiere zu einem längeren Überleben vor allem in der Frühphase nach Krankheitsbeginn.

Eine Therapie des SHPT über eine Korrektur des Calcitriol-Defizites gelang in dieser Studie nicht. Trotz hoher Dosen an Calcidiol bzw. Calcitriol konnte bei den CKD 4-5-Mäusen keine Normalisierung der Calcitriol-Spiegel, geschweige denn darüber eine Verhinderung des SHPT erreicht werden. Diese nebenwirkungsfreie Verabreichung äußerst hoher Vitamin D-Dosen bestätigt die oben bereits diskutierte Hypothese des massiven Verlustes von Vitamin D über den proteinurischen Urin. Derartige hohe Dosen an Vitamin D, wie sie in dieser Untersuchung verabreicht wurden, führten in anderen Studien zu massiver Hypercalciämie und aortalen Verkalkungen [85]. Zu diskutieren ist nun, ob eine weitere Steigerung der bisher nebenwirkungsfreien Calcidiol- bzw. Calcitrioldosis nicht vielleicht doch zu einer Wirkung geführt hätte. Dem ist aber entgegenzustellen, dass die bereits verabreichten Dosen bei den Tieren unter Calcidiol- bzw. Calcitriol-Therapie gegenüber den unbehandelten Tieren zu einem Anstieg des Plasma-Phosphates, dem hier als treibende Kraft des SHPT identifizierten Parameter, geführt haben und dadurch zwar eventuell eine Korrektur der Hypovitaminose, aber wohl nicht des SHPT gelungen wäre.

4.3 Ausblick

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wäre es denkbar, die aus pathophysiologischer Sicht sinnvolle Therapie mit Vitamin D in weiteren Versuchen genauer zu untersuchen. Hierbei sollte an eine weitere Dosissteigerung bzw. eine höhere Dosisdichte bei der Vitamin D-Applikation gedacht werden, die, solange es zu keinen Nebenwirkungen kommt, durchaus denkbar ist. Ebenfalls wäre eine Kombination aus Phosphatrestriktion und Vitamin D-Substitution ein weiterer Ansatzpunkt, um SHPT und Hypovitaminose zu behandeln. Interessant wären hierbei auch die Art und das Ausmaß der Therapieinteraktion. Ebenso interessant wären Untersuchungen mit einem Therapiestart erst nach Manifestation des SHPT. Auch die Hypothese einer Nierenschädigung durch die anhaltende Phosphaturie, die sich in dieser Arbeit bereits andeutungsweise als plausibel erwiesen hat, könnte durch hierauf fokussierte Untersuchungen an diesem Mausmodell und anhand weiterer Überlebensstudien und Histologien mit größeren Fallzahlen noch eingehender untersucht werden.

Wünschenswert wären darüber hinaus Untersuchungen an Patienten, die ähnliche Konstellationen wie sie in diesem Mausmodell auftreten, bieten, mit dem Ziel, die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen.

Ebenfalls eher klinisch geprägt wären weitere Untersuchungen, die darauf abzielten, FGF23 als einen der Bestimmung der Hyperphosphatämie überlegenen, sensitiveren Marker als Trigger für eine Präventivtherapie eines SHPT zu verwenden.

Neben Untersuchungen zum Thema SHPT bei CKD gibt diese Arbeit Anstoß zu weiter reichenden Experimenten auf der Grundlage des hier verwendeten, äußerst vielseitigen Mausmodells. Aktuell gibt es kein vergleichbares Mausmodell, das es ermöglicht, in relativ einfacher Handhabung differenzierte Untersuchungen einer proteinurischen Niereninsuffizienz

durchzuführen. Denkbar wären hier - um nur zwei Beispiele zu nennen - Untersuchungen zum nephrotischen Syndrom oder zur nierenschädigenden Wirkung einer chronischen Proteinurie. Darüber hinaus bietet das Modell über Einkreuzung genetischer Veränderungen, wie beispielsweise Knockouts, weitere weitreichende Möglichkeiten.

4.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie weitere Belege für eine entscheidende Rolle einer Phosphatretention bei der Entwicklung des SHPT liefert und diesem in der Folge durch strikte Phosphatrestriction vorgebeugt werden kann, sobald erhöhte FGF23-Werte nachgewiesen wurden. Ein Substitutionsversuch mit nativem Vitamin D zeigte ebenso wie die Substitution mit aktivem Vitamin D in den hier angewandten Dosierungen keinen Effekt auf die Entwicklung eines SHPT.

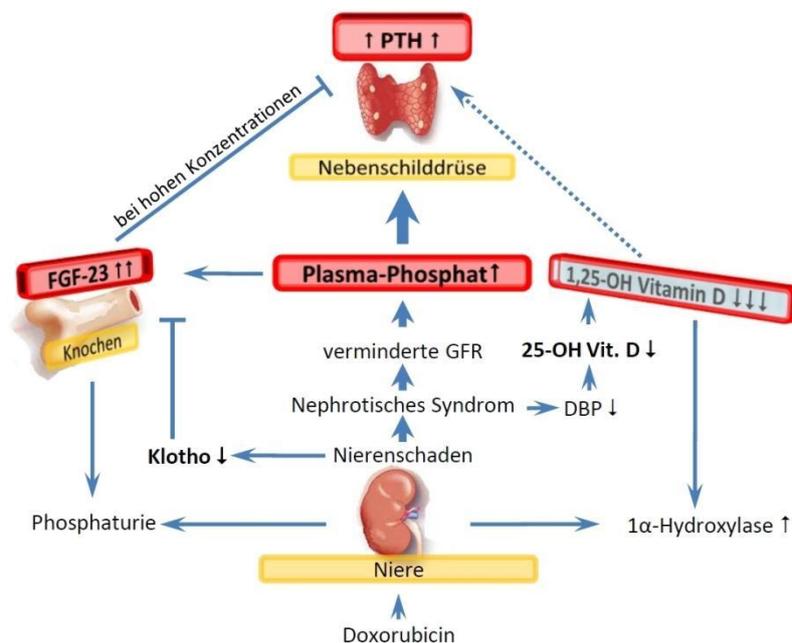


Abb. 4.1: Abfolge pathophysiologischer Ereignisse in der Entstehung eines SHPT bei Doxorubicin-induzierter Nephropathie, publiziert in [100]

Wie in dieser Arbeit gezeigt, stellt die Hyperphosphatämie die treibende Kraft bei der Entwicklung des SHPT in diesem Modell dar. In der Folge kann der SHPT durch phosphatarmer Diät komplett verhindert werden. Der Vitamin D-Mangel hingegen scheint in diesem Modell keine wesentliche Rolle zu spielen.

5. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung und Beschreibung von FGF23 als zentralem Element im Phosphat-Stoffwechsel hat sich im Verständnis des SHPT einiges getan und die Sichtweise des SHPT hat sich hin zu einer phosphozentrischeren gewandelt. Trotz des immer besseren Verständnisses der Pathophysiologie des SHPT ist bisher die optimale Strategie zur Behandlung und Unterdrückung des SHPT sowie die Relevanz von Phosphatrestriktion und Vitamin D-Substitution noch nicht eindeutig geklärt.

In einem proteinurischen Mausmodell wurde an 129 S1/SvImJ Wildtyp-Mäusen die Entwicklung des SHPT untersucht. Darüber hinaus wurden Phosphatrestriktion, Calcidiol bzw. Calcitriol als Therapiestrategien untersucht.

Die Entwicklung des SHPT war stark vom Ausmaß der induzierten Proteinurie abhängig. Tiere mit milder Proteinurie (< 100 mg/mg Kreatinin) zeigten einen milden SHPT, während die FGF23-, Phosphat- und Harnstoffwerte nahezu stabil blieben. Tiere mit starker Proteinurie (> 100 mg/mg Kreatinin) dagegen zeigten einen deutlichen SHPT, der mit massiv angestiegenen FGF23-Werten, Hyperphosphatämie, Nierenversagen und Depletion von sowohl 25-Hydroxy-Vitamin D als auch 1,25-Dihydroxy Vitamin D einherging.

Eine Substitution mit Calcidiol oder Calcitriol war nicht in der Lage den SHPT zu unterdrücken. Mit phosphatarmer Diät gelang es hingegen, den SHPT sowohl bei den Mäusen mit milder als auch mit starker Proteinurie zu unterdrücken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem proteinurischen Modell der SHPT aus einer Phosphatretention resultierte und folglich in vollem Umfang durch eine phosphatarmer Diät unterdrückt werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Hagemann O: Laborlexikon, Regulation des Calciumhaushaltes - Facharztwissen für alle [online], 2014, URL: <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Abbildungen/06-Calciumhaushalt.htm>, [Zugriff: 14.04.2015].
- 2 KDIGO CKD Work Group: Kdigo 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2013) 2012;3:1-150.
- 3 Razzaque MS: Fgf23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: Is klotho an essential player? , 2009.
- 4 Immutopics I: Mouse pth 1-84 elisa kit - manual of instruction, 2013.
- 5 immunodiagnosticsystems I: Ids 1,25-dihydroxy vitamin d eia - manual of instruction, 2008.
- 6 Isakova T, Wolf MS: Fgf23 or pth: Which comes first in ckd ? *Kidney international* 2010;78:947-949.
- 7 Hans Oberleithner; 2010; Salz- und Wasserhaushalt - Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts; Ss. 407 - 411; Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagel; Physiologie; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York.
- 8 Bergwitz C, Juppner H: Regulation of phosphate homeostasis by pth, vitamin d, and fgf23. *Annual review of medicine* 2010;61:91-104.
- 9 Kemper B, Habener JF, Rich A, Potts JT, Jr.: Parathyroid secretion: Discovery of a major calcium-dependent protein. *Science (New York, NY)* 1974;184:167-169.
- 10 Diaz R, EM B: Familial hypocalciuric hypercalcemia and other disorders due to calcium-sensing receptor mutations; in J. Larry Jameson M, PhD and Leslie J. De Groot, MD (ed) *Endocrinology*. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006, vol 1, pp 1595-1609.
- 11 Wettschureck N, Lee E, Libutti SK, Offermanns S, Robey PG, Spiegel AM: Parathyroid-specific double knockout of gq and g11 alpha-subunits leads to a phenotype resembling germline knockout of the extracellular ca²⁺-sensing receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2007;21:274-280.
- 12 Thomas J. Gardella, Harald Jüppner, Edward M. Brown, Henry M. Kronenberg, Potts Jr. JT: Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development, in J. Larry Jameson M, PhD and Leslie J. De Groot, MD (ed) *Endocrinology*. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006, vol 1, pp 1377-1417.
- 13 Quinn SJ, Kifor O, Kifor I, Butters RR, Jr., Brown EM: Role of the cytoskeleton in extracellular calcium-regulated pth release. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;354:8-13.
- 14 Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T: Rna-protein binding and post-

- transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:5253-5259.
- 15 Kousteni S, Bilezikian JP: The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts. *Current osteoporosis reports* 2008;6:72-76.
- 16 Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H: Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney international* 2006;70:1548-1559.
- 17 Alpern RJ: Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiological reviews* 1990;70:79-114.
- 18 Friedman PA, Gesek FA: Calcium transport in renal epithelial cells. *The American journal of physiology* 1993;264:F181-198.
- 19 Bouillon R: Vitamin d : From photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications; in J. Larry Jameson M, PhD and Leslie J. De Groot, MD (ed) *Endocrinology*. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006, vol 1, pp 1435-1463.
- 20 Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC: The autosomal dominant hypophosphatemic rickets r176q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:9843-9849.
- 21 Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin d. *American journal of physiology Renal physiology* 2005;289:F8-28.
- 22 Li YC, Pirro AE, Amling M, Dellling G, Baron R, Bronson R, Demay MB: Targeted ablation of the vitamin d receptor: An animal model of vitamin d-dependent rickets type ii with alopecia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:9831-9835.
- 23 Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D: Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin d 1alpha -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:7498-7503.
- 24 Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Sato T, Okumura K, Nogami M, Hasegawa Y, Niimi H, Yanagisawa J, Tanaka T, Kato S: Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin d3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin d-deficiency rickets. *The New England journal of medicine* 1998;338:653-661.
- 25 Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, Kesterson RA, Pike JW, Feldman D, O'Malley BW: Point mutations in the human vitamin d receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science (New York, NY)* 1988;242:1702-1705.
- 26 Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, Tani Y, Arai H,

- Tatsumi S, Morita K, Taketani Y, Takeda E: Regulation of intestinal na+-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin d3. *The Biochemical journal* 1999;343 Pt 3:705-712.
- 27 Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnoud R, Murer H, Biber J: Intestinal and renal adaptation to a low-pi diet of type ii napi cotransporters in vitamin d receptor- and 1alphaohase-deficient mice. *American journal of physiology Cell physiology* 2005;288:C429-434.
- 28 Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB: Rescue of the skeletal phenotype of vitamin d receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 1999;140:4982-4987.
- 29 Canaff L, Hendy GN: Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin d response elements in promoters p1 and p2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin d. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:30337-30350.
- 30 Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM: Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin d3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:8097-8101.
- 31 Suzuki Y, Landowski CP, Hediger MA: Mechanisms and regulation of epithelial ca2+ absorption in health and disease. *Annual review of physiology* 2008;70:257-271.
- 32 Herold G und Mitarbeiter; 2012; *Renale Osteopathie*; Ss. 630 - 632; Gerd Herold; *Innere medizin 2012 : Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung*; G. Herold, Köln.
- 33 Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N: Identification of a novel fibroblast growth factor, fgf-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;277:494-498.
- 34 Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T: Targeted ablation of fgf23 demonstrates an essential physiological role of fgf23 in phosphate and vitamin d metabolism. *The Journal of clinical investigation* 2004;113:561-568.
- 35 Torres PA, De Brauwere DP: Three feedback loops precisely regulating serum phosphate concentration. *Kidney international* 2011;80:443-445.
- 36 Silver J, Naveh-Many T: Fgf-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 2013;9:641-649.
- 37 Martin A, David V, Quarles LD: Regulation and function of the fgf23/klotho

- endocrine pathways. *Physiological reviews* 2012;92:131-155.
- 38 Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ, Quarles LD: Bone proteins phex and dmp1 regulate fibroblastic growth factor fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving fgf receptor (fgfr) signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:2551-2562.
- 39 Wohrle S, Bonny O, Beluch N, Gaulis S, Stamm C, Scheibler M, Muller M, Kinzel B, Thuery A, Brueggen J, Hynes NE, Sellers WR, Hofmann F, Graus-Porta D: Fgf receptors control vitamin d and phosphate homeostasis by mediating renal fgf-23 signaling and regulating fgf-23 expression in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011;26:2486-2497.
- 40 Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T: Pth increases fgf23 gene expression and mediates the high-fgf23 levels of experimental kidney failure: A bone parathyroid feedback loop. *American journal of physiology Renal physiology* 2010;299:F882-889.
- 41 Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK: 1alpha,25-dihydroxyvitamin d3 upregulates fgf23 gene expression in bone: The final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2005;289:G1036-1042.
- 42 Saini RK, Kaneko I, Jurutka PW, Forster R, Hsieh A, Hsieh JC, Haussler MR, Whitfield GK: 1,25-dihydroxyvitamin d(3) regulation of fibroblast growth factor-23 expression in bone cells: Evidence for primary and secondary mechanisms modulated by leptin and interleukin-6. *Calcified tissue international* 2013;92:339-353.
- 43 Quarles LD: Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:3820-3828.
- 44 Rowe PS: Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: The phex, fgf23, dmp1, mepe asarm pathway. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2012;22:61-86.
- 45 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer* 2000;7:165-197.
- 46 Ornitz DM, Itoh N: Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2001;2:Reviews3005.
- 47 Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: Klotho converts canonical fgf receptor into a specific receptor for fgf23. *Nature* 2006;444:770-774.
- 48 Kuro-o M: Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2006;15:437-441.

- 49 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
- 50 Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K: Immunohistochemical localization of *klotho* protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell structure and function* 2004;29:91-99.
- 51 Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW: *Klotho*: A novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010;24:3438-3450.
- 52 Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR: Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of *klotho* by *adam10* and *adam17*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:19796-19801.
- 53 Li H, Martin A, David V, Quarles LD: Compound deletion of *fgfr3* and *fgfr4* partially rescues the hyp mouse phenotype. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2011;300:E508-517.
- 54 Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: Fgf-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2004;19:429-435.
- 55 Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M: Fgf23 decreases renal *npt2a* and *npt2c* expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via *fgf* receptor 1. *American journal of physiology Renal physiology* 2009;297:F282-291.
- 56 Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD: *Fgfr3* and *fgfr4* do not mediate renal effects of *fgf23*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008;19:2342-2350.
- 57 Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE: Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *The Journal of endocrinology* 2007;195:125-131.
- 58 Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J: The parathyroid is a target organ for *fgf23* in rats. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:4003-4008.
- 59 Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, Juppner H, Lanske B: Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23

- results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in phex-deficient mice. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2004;23:421-432.
- 60 Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N: Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008;23:939-948.
- 61 Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB: Circulating concentration of fgf-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney international* 2003;64:2272-2279.
- 62 Evenepoel P, Meijers B, Viaene L, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanderschueren D, Vanrenterghem Y: Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: Additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2010;5:1268-1276.
- 63 Goodman WG, Quarles LD: Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: Lessons from molecular genetics. *Kidney international* 2008;74:276-288.
- 64 Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T: Direct evidence for a causative role of fgf23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin d metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney international* 2010;78:975-980.
- 65 Thrailkill KM, Jo CH, Cockrell GE, Moreau CS, Fowlkes JL: Enhanced excretion of vitamin d binding protein in type 1 diabetes: A role in vitamin d deficiency? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011;96:142-149.
- 66 Doorenbos CR, de Cuba MM, Vogt L, Kema IP, van den Born J, Gans RO, Navis G, de Borst MH: Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin d-binding protein but does not affect vitamin d status in patients with chronic kidney disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2012;128:56-61.
- 67 KDIGO CKD Work Group: Kdigo clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (ckd-mbd). *Kidney international Supplement* 2009:S1-130.
- 68 Silver J, Yalcindag C, Sela-Brown A, Kilav R, Naveh-Many T: Regulation of the parathyroid hormone gene by vitamin d, calcium and phosphate. *Kidney international Supplement* 1999;73:S2-7.
- 69 Kuro OM: A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of

- chronic kidney disease. *Kidney international supplements* 2013;3:420-426.
- 70 Kuro-o M: Klotho, phosphate and fgf-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nature reviews Nephrology* 2013;9:650-660.
- 71 Artunc F, Nasir O, Amann K, Boini KM, Haring HU, Risler T, Lang F: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *American journal of physiology Renal physiology* 2008;295:F1624-1634.
- 72 Matsui I, Hamano T, Tomida K, Inoue K, Takabatake Y, Nagasawa Y, Kawada N, Ito T, Kawachi H, Rakugi H, Imai E, Isaka Y: Active vitamin d and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:2354-2361.
- 73 Gratzer W, Beaven G: Use of the metal-ion indicator, arsenazo iii, in the measurement of calcium binding. *Analytical biochemistry* 1977;81:118-129.
- 74 Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K, Tokuda K: Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a hitachi 726 automated analyzer. *Clinical chemistry* 1986;32:1551-1554.
- 75 Fawcett J, Scott J: A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology* 1960;13:156-159.
- 76 Chen PS, Toribara TY, Warner H: Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry* 1956;28:1756-1758.
- 77 Hervey GR: Determination of creatinine by the jaffe reaction. *Nature* 1953;171:1125.
- 78 Riehm H: Bestimmung von natrium, kalium und calcium im flammenphotometer nach riehm-lange. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1948;128:249-264.
- 79 Maiolini R, Masseyeff R: A sandwich method of enzymeimmunoassay. I. Application to rat and human alpha-fetoprotein. *Journal of immunological methods* 1975;8:223-234.
- 80 Van Weemen BK, Schuurs AH: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971;15:232-236.
- 81 Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160.
- 82 Nolan T, Hands RE, Bustin SA: Quantification of mrna using real-time rt-pcr. *Nature protocols* 2006;1:1559-1582.
- 83 el Nahas AM, Bassett AH, Cope GH, Le Carpentier JE: Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney international* 1991;40:29-34.

- 84 Veniant M, Heudes D, Clozel JP, Bruneval P, Menard J: Calcium blockade versus ace inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2k-1c rats. *Kidney international* 1994;46:421-429.
- 85 Noonan W, Koch K, Nakane M, Ma J, Dixon D, Bolin A, Reinhart G: Differential effects of vitamin d receptor activators on aortic calcification and pulse wave velocity in uraemic rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008;23:3824-3830.
- 86 Nagano N, Miyata S, Abe M, Kobayashi N, Wakita S, Yamashita T, Wada M: Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating pth and fgf23 in renal failure rats. *Kidney international* 2006;69:531-537.
- 87 Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequence of pathologic events. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1982;46:16-23.
- 88 Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'Agati VD, Gharavi AG: A mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:2502-2507.
- 89 Polhill T, Zhang GY, Hu M, Sawyer A, Zhou JJ, Saito M, Webster KE, Wang Y, Wang Y, Grey ST, Sprent J, Harris DC, Alexander SI, Wang YM: Il-2/il-2ab complexes induce regulatory t cell expansion and protect against proteinuric ckd. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012;23:1303-1308.
- 90 Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD: Serum fgf23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003;18:1227-1234.
- 91 Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, Fukagawa M: Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2004;44:250-256.
- 92 Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M: Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16:2205-2215.
- 93 Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC: Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (r176q) delineate a putative role for

- parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology* 2004;145:5269-5279.
- 94 Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S: 25-hydroxyvitamin d3 1alpha-hydroxylase and vitamin d synthesis. *Science (New York, NY)* 1997;277:1827-1830.
- 95 Helvig CF, Cuerrier D, Hosfield CM, Ireland B, Kharebov AZ, Kim JW, Ramjit NJ, Ryder K, Tabash SP, Herzenberg AM, Epps TM, Petkovich M: Dysregulation of renal vitamin d metabolism in the uremic rat. *Kidney international* 2010;78:463-472.
- 96 Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, Inokami T, Hara S, Yamada A, Kurokawa K, Uchida S: Gene expression of vitamin d hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney international* 2003;64:414-420.
- 97 Satomura K, Seino Y, Yamaoka K, Tanaka Y, Ishida M, Yabuuchi H, Tanaka Y, DeLuca HF: Renal 25-hydroxyvitamin d3-1-hydroxylase in patients with renal disease. *Kidney international* 1988;34:712-716.
- 98 Nowak A, Friedrich B, Artunc F, Serra AL, Breidthardt T, Twerenbold R, Peter M, Mueller C: Prognostic value and link to atrial fibrillation of soluble klotho and fgf23 in hemodialysis patients. *PloS one* 2014;9:e100688.
- 99 Christov M, Waikar SS, Pereira RC, Havasi A, Leaf DE, Goltzman D, Pajevic PD, Wolf M, Juppner H: Plasma fgf23 levels increase rapidly after acute kidney injury. *Kidney international* 2013;84:776-785.
- 100 Bohnert BN, Daniel C, Amann K, Voelkl J, Alesutan I, Lang F, Heyne N, Haring HU, Artunc F: Impact of phosphorus restriction and vitamin d-substitution on secondary hyperparathyroidism in a proteinuric mouse model. *Kidney Blood Press Res* 2015;40:153-165.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Artunc.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Professor Artunc von mir eigenständig durchgeführt.

Die Einarbeitung in die PCR-Methodik erfolgte durch Frau A. Janessa (MTA), die die Messungen am LightCycler 1,5 der Firma Roche durchführte.

Die histologische Aufarbeitung der entnommenen Nieren sowie Aorten und die Bestimmung der Glomerulosklerose Indices (GSI) sowie der Tubulären Schädigungsindices (TSI) erfolgte in der Nephropathologischen Abteilung von Frau Professor Dr. K. Amann am Universitätsklinikum Erlangen durch Herrn Privatdozent Dr. C. Daniel.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8. Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Poster:

„Entstehung des sekundären Hyperparathyreoidismus in einem proteinurischen Mausmodell und dessen therapeutische Beeinflussung durch Phosphatrestriktion oder Vitamin-D-Substitution“

Bernhard Bohnert, Christoph Daniel, Kerstin Amann, Ferruh Artunc

Auf dem

Kongress für Nephrologie 2013; 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; 5. – 8. Oktober 2013, Berlin

Paper:

„Impact of phosphorus restriction and Vitamin D-substitution on secondary hyperparathyroidism in a proteinuric mouse model“

Bernhard N. Bohnert, Christoph Daniel, Kerstin Amann, Jakob Voelkl, Ioana Alesutan, Florian Lang, Nils Heyne, Hans-Ulrich Häring, Ferruh Artunc

in

Kidney & Blood Pressure Research, S. Karger Verlag, Basel, angenommen 23.02.2015, online publiziert 29.03.2015, Vol. 40, No. 2, pp. 153-165.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Artunc für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die gute und umfassende Betreuung während der gesamten Dauer dieser Arbeit bedanken.

Lieber Ferruh, ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können. Es war mir eine Freude bei Dir zu promovieren, herzlichen Dank!

Des Weiteren gilt mein Dank der Nephropathologischen Abteilung von Frau Professor Dr. K. Amann am Universitätsklinikum Erlangen und hier im Besonderen Herrn Privatdozent Dr. C. Daniel für die reibungslose Zusammenarbeit bei der histopathologischen Aufarbeitung der Nieren.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den angestellten Mitarbeiterinnen der Nephrologischen Labore und im Besonderen bei Andrea Janessa bedanken, die mir mit Ihrem Wissen bei kleineren und größeren Problemen des Laboralltags stets weiterzuhelfen wussten.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Mit-DoktorandInnen danken, die mich bei der Wochenend- und Ferienbetreuung der Mäuse unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Bohnert
Vorname: Bernhard Nikolaus
Geburtsdatum: 29. Juni 1989
Geburtsort: Ochsenhausen, BC

Schulbildung:

August 1995 bis Juli 1999 Grund- und Hauptschule mit
Werkrealschule Baidt
August 1999 bis Juni 2008 Studienkolleg St. Johann Blönried
Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst:

August 2008 bis April 2009 Oberschwabenklinik
KKH St. Elisabeth Ravensburg, Kardiologie

Studium:

SS 2009 bis WS 2010/2011 Humanmedizin, Vorklinik an der
Eberhard Karls Universität zu Tübingen
04.04.2011, Staatsexamen M1 (Physikum)
SS 2011 bis WS 2013/2014 Humanmedizin, Klinik an der
Eberhard Karls Universität zu Tübingen
10.04.2014, Staatsexamen M2
Mai 2014 bis April 2015 Praktisches Jahr (PJ) am
Universitätsklinikum Tübingen (UKT)
Chirurgie, Innere Medizin und Radiologie
11.06.2015, Staatsexamen M3

Promotion:

*„Untersuchung des Sekundären Hyperparathyreoidismus in einem
Mausmodell der chronisch progredienten Niereninsuffizienz“*

Mai 2012 bis Dezember 2015 Universitätsklinikum Tübingen
Medizinische Klinik, Abteilung IV
Sektion für Nieren- und Hochdruckkrank-
heiten
Nierenphysiologie, AG Prof. Dr. F. Artunc

ANHANG

Tabelle 7: Tierversuch und Sterblichkeit, publiziert in [100]

Die Tabelle schlüsselt den Tierversuch in den jeweiligen Versuchen auf und gibt Auskunft über den Anteil nicht-nephrotischer Tiere (CKD 1-3-Verlaufsform) sowie den Anteil der vor Erreichen des jeweiligen Endpunktes verstorbenen Tiere.

	injiziert	nicht-nephrotisch (CKD 1-3)	verstorbene Tiere
Verlaufsuntersuchungen			
- Endpunkt Tag 10	18	12	2
- Endpunkt Tag 30	19	7	5
präemptive Therapieserien			
- phosphatarmer Diät	16	6	5
- Therapie mit Calcidiol	14	4	3
- Therapie mit Calcitriol	18	8	2
interventionelle Therapieserien			
- Kontrollarm	14	0	3
- Therapiearm		0	1

Tabelle 8: Proteinbestimmung Pyrogallolrot Methode: Standardkurve

Probe (standard) + 300 µl Reagenz				
standard	1300 mg/l			
	eingesetztes Volumen, [µl]	Vol. korr. Konz	Mean (n=4)	mean – mean(bl)
	bl (aqua) 0	0,00	0,189	0,000
	1	436,21	0,241	0,052
	2	869,54	0,281	0,093
1300 mg/l	3	1300,00	0,327	0,139
	4	1727,63	0,366	0,177
	5	2152,46	0,389	0,200
	6	2574,51	0,427	0,239
	7	2993,81	0,451	0,263
	8	3410,39	0,478	0,290
	9	3824,27	0,500	0,311
	10	4235,48	0,530	0,342
	11	4644,05	0,551	0,363
	12	5050,00	0,561	0,373
	13	5453,35	0,586	0,398
	14	5854,14	0,592	0,404
	15	6252,38	0,610	0,422
	16	6648,10	0,615	0,426
	17	7041,32	0,629	0,441
	18	7432,08	0,637	0,448

Polynomiell Anpassung an den Datensatz
nebenstehender Tabelle, unter Benutzung der
Funktion: $a_0 + a_1 \cdot x + a_2 \cdot x^2$
Y Standardfehler: Unbekannt
Von $x = 0$ bis $x = 5.854,14$

$a_0 = 0,00530575506749212 \quad +/-$
 $0,00327284792642806$

$a_1 = 0,000106714063485479 \quad +/-$
 $2,5752500124771e-06$

$a_2 = -6,55432874415179e-09 \quad +/-$
 $4,2273777789676e-10$

$\text{Chi}^2/\text{doF} = 2,25381306548519e-05$
 $R^2 = 0,998840963693009$

Anhang

R ² r p	GSI	TSI	24 Ohase	1alpha	Klotho	Phosphat- urie Tag 10	Proteinurie Tag 10	free Ca	Hkt	K	Na	Ig 1,25OH	Ig 25OH	Ig FGF23	Ig PTH	Eiweiß	HST	Ca
P	0,4297 0,6555 0,0396*	0,4855 0,6968 0,0251*	0,1082 0,3289 0,1085	0,4332 0,6582 0,0005***	0,3157 -0,5619 0,0035**	0,1442 0,3797 0,01571	0,1035 0,3217 0,0429*	0,03272 -0,1809 0,2136	0,1078 -0,3283 0,0213*	0,2036 0,4512 0,0011**	0,3861 -0,6213 0,0001***	0,1305 -0,3613 0,016*	0,1358 -0,3686 0,0127*	0,5913 0,769 0,0001***	0,01246 0,1116 0,4354	0,1555 -0,3943 0,0042**	0,4263 0,6529 0,0001***	0,003336 0,05775 0,6873
Ca	0,3099 -0,5567 0,0946	0,1935 -0,4399 0,2033	0,01091 0,1045 0,6193	0,03701 -0,1924 0,3569	0,0000499 0,007064 0,9733	0,003974 -0,06304 0,6992	0,0008366 -0,02892 0,8594	0,05064 0,225 0,12	0,006273 0,0792 0,5885	0,001222 0,03496 0,8115	0,01394 0,1181 0,4194	0,007675 0,08761 0,5717	0,01551 -0,1245 0,415	0,00001359 -0,003687 0,9795	0,009772 0,09885 0,4901	0,1045 0,3233 0,0207*	0,009119 -0,09549 0,505	
HST	0,639 0,7993 0,0055**	0,3239 0,5691 0,0859	0,05736 0,2395 0,2489	0,4306 0,6562 0,0004***	0,5874 -0,7664 0,0001***	0,1323 0,3637 0,021*	0,1357 0,3684 0,0193*	0,07651 -0,2766 0,0544	0,04792 -0,2189 0,1307	0,1746 0,4179 0,0028**	0,2008 -0,4481 0,0012**	0,3923 -0,6264 0,0001***	0,07366 -0,2714 0,0713	0,5058 0,7112 0,0001***	0,01859 0,1363 0,3401	0,2973 -0,5452 0,0001***		
Eiweiß	0,4304 -0,656 0,0394*	0,1032 -0,3213 0,3654	0,1953 -0,4419 0,027*	0,1729 -0,4158 0,0387*	0,5027 0,709 0,0001***	0,2423 -0,4923 0,0013**	0,3339 -0,5778 0,0001***	0,04509 0,2123 0,143	0,03205 0,179 0,2184	0,0393 -0,1982 0,1721	0,1326 0,3641 0,0101*	0,4612 0,6791 0,0001***	0,1746 0,4179 0,0043**	0,1262 -0,3553 0,0105*	0,01349 0,1161 0,417			
Ig PTH	0,1695 0,4117 0,2371	0,1423 0,3772 0,2825	0,05867 -0,2422 0,2434	0,09506 0,3083 0,1338	0,1384 -0,372 0,0671	0,01708 0,1307 0,4215	0,000009007 0,003001 0,9853	0,09325 -0,3054 0,0329*	0,03917 -0,1979 0,1728	0,01491 0,1221 0,4033	0,03639 -0,1908 0,1892	0,01123 -0,106 0,4935	0,02016 -0,142 0,3522	0,05138 0,2267 0,1097				
Ig FGF23	0,7913 0,8895 0,0006***	0,7503 0,8662 0,0012**	0,2613 0,5112 0,009**	0,3936 0,6274 0,0008***	0,4348 -0,6594 0,0003***	0,09788 0,3129 0,0493*	0,1515 0,3892 0,0131*	0,3929 -0,1982 0,1722	0,2268 -0,4763 0,0005***	0,114 0,3377 0,0177*	0,3679 -0,6066 0,0001***	0,2879 -0,5366 0,0002***	0,1465 -0,3827 0,00995**					
Ig 25OH	0,2471 -0,4971 0,1438	0,3068 -0,5539 0,0967	0,01854 -0,1362 0,5163	0,03349 -0,183 0,3812	0,01312 0,1145 0,5857	0,01258 -0,1122 0,4908	0,09002 -0,3 0,06	0,01226 0,1107 0,4797	0,07322 0,2706 0,0792	0,174 -0,4171 0,0054**	0,174 0,4919 0,0008***	0,2419 0,6497 0,0001***	0,4221 0,1161 0,0001***					
Ig 1,25OH	0,6136 -0,7833 0,0074**	0,2519 -0,5019 0,1394	0,1042 -0,3228 0,1155	0,09658 -0,3108 0,1305	0,2578 0,5077 0,0096**	0,05241 -0,2289 0,161	0,1279 -0,3577 0,0254*	0,0854 0,2922 0,0604	0,03731 0,1932 0,2204	0,08056 -0,2838 0,0685	0,1214 0,3484 0,0238*							
Na	0,1063 -0,326 0,392	0,4218 -0,6495 0,0584	0,002948 -0,05429 0,8011	0,5389 -0,7341 0,0001***	0,1951 0,4417 0,0307*	0,02819 -0,1679 0,3136	0,09654 -0,3107 0,0576	0,1292 0,3595 0,0112*	0,1153 0,3395 0,017*	0,56 -0,7484 0,0001***								
K	0,001772 0,0421 0,9144	0,1941 0,4405 0,2353	0,03261 0,1806 0,3984	0,3281 0,5728 0,0034**	0,09597 -0,3098 0,1407	0,01124 0,106 0,5264	0,1077 0,3282 0,0442*	0,04249 -0,2061 0,1553	0,04828 -0,2197 0,1293									
Hkt	0,2174 -0,4662 0,2059	0,4798 -0,6927 0,0386*	0,01635 -0,1279 0,5516	0,2199 -0,469 0,0208*	0,008312 0,09117 0,6718	0,147 -0,3834 0,0175*	0,211 -0,4593 0,0037**	0,007756 0,08807 0,5474										
free Ca	0,2983 -0,5462 0,1281	0,7314 -0,8552 0,0033*	0,03219 0,1794 0,4015	0,4961 -0,7043 0,0001***	0,1746 0,4179 0,0422*	0,05348 -0,2313 0,1624	0,05024 -0,2241 0,1761											
Proteinurie Tag 10	0,01672 -0,1293 0,7219	0,03339 0,1827 0,6134	0,159 0,3987 0,0661	0,001905 -0,04364 0,8471	0,0189 0,1375 0,5418	0,3897 0,6243 0,0001***												
Phosphat- urie Tag 10	0,0913 0,3022 0,3961	0,07902 0,2811 0,4314	0,112 0,3346 0,128	0,06093 0,2468 0,2681	0,1299 -0,3604 0,0994													
Klotho	0,676 -0,8222 0,0035**	0,3119 -0,5585 0,0933	0,04546 -0,2132 0,3062	0,3607 -0,6006 0,0015**														
1alpha	0,3074 0,5544 0,0963	0,5554 0,7452 0,0134*	0,006432 -0,0802 0,7031															
24 Ohase	0,4704 0,6858 0,0286*	0,4749 0,6891 0,0275*																
TSI	0,639 0,7994 0,0055**																	

Legende

- * p<0,05
- ** p<0,01
- *** p<0,001

- r >0,7
- r 0,5 - 0,7
- r 0,3 - 0,5
- r <0,3

Tabelle 9: Korrelationen

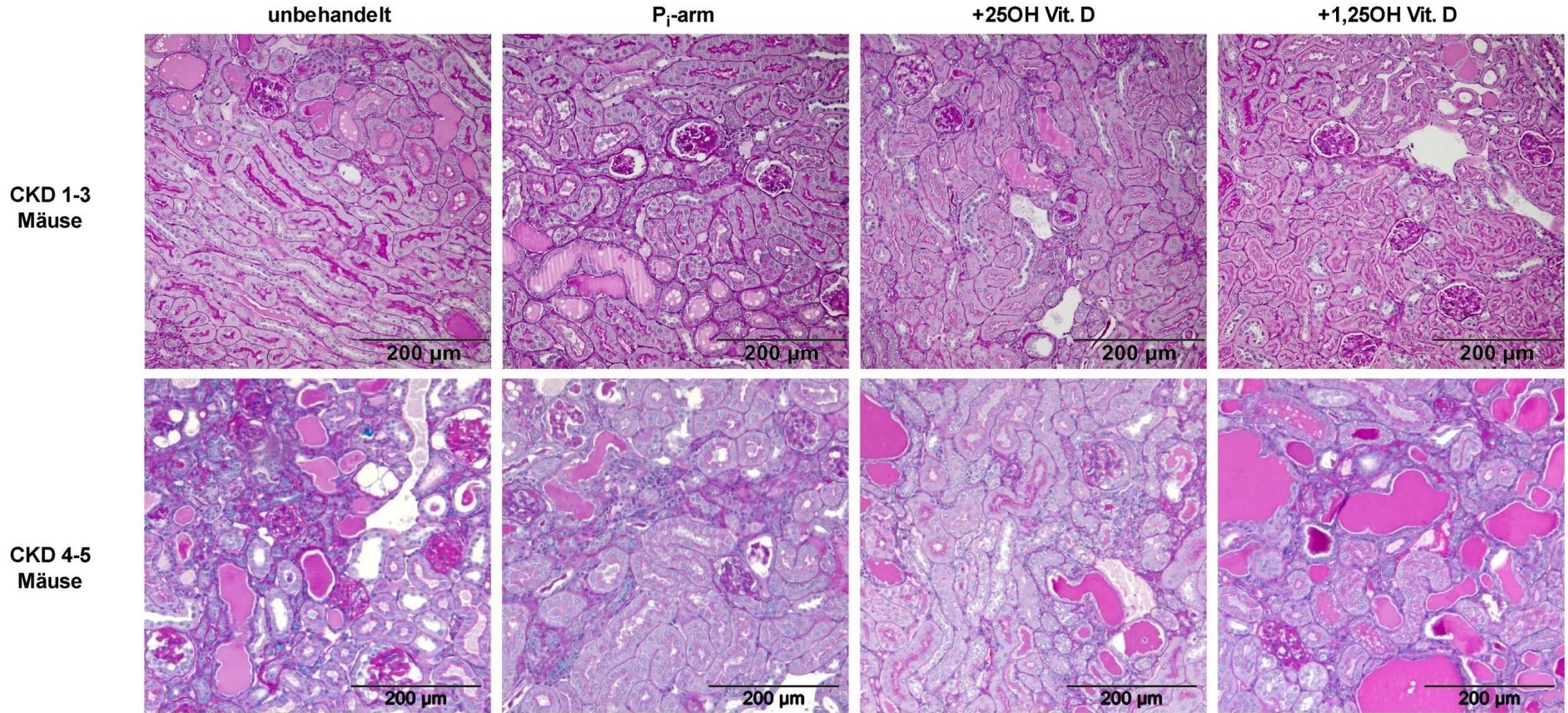


Abb. 8.1: Nierenschnitte nach 30 Tagen Verlauf, publiziert in [100]

PAS-Färbung, 400fach vergrößert