



**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV –
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Zusammenhang von FGF 23 mit der hormonellen
Regulation des Salz- und Volumenhaushalts bei
gesunden Probanden**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät

der

Ludwig-Maximilian-Universität zu München

Vorgelegt von

Thomas Tröger

aus

München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Fischereider

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Schmolke
PD Dr. Gerald Bastian Schulz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Grundlagen	7
2.1. Der Fibroblast Growth Factor 23.....	7
2.2 FGF23 und die Vitamin D-Parathormon-Achse.....	9
2.3. FGF23 in der Niereninsuffizienz.....	10
2.4. FGF23 und das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)	11
2.5. Die Regulation des Salz- und Volumenhaushalts im Menschen	13
2.6. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	13
2.7. Das antidiuretische Hormon ADH (Vasopressin).....	14
3. Fragestellung	15
4. Methoden.....	16
4.1. Testverfahren	16
4.1.1. Der Kochsalzbelastungstest.....	16
4.1.2. Der orale Wasserbelastungstest	17
4.1.3. Der Furosemidtest (Renin-Aldosteron-Stimulationstest).....	18
4.2. Studiendesign	18
4.3. Testgruppe und Durchführung.....	19
4.4. Bestimmung der Werte	20
4.5. Erstellung einer Datenbank	21
4.6. Statistische Auswertung.....	22
5. Ergebnisse.....	22
5.1. Allgemeine Ergebnisse	22
5.2. Der Kochsalzbelastungstest.....	24
5.3. Der Furosemidtest	35
5.4. Der orale Wasserbelastungstest	44
5.5. Spezielle Ergebnisse	54
5.6. FGF 23 und das RAAS.....	55
6. Diskussion der Ergebnisse.....	59
6.1. Der Kochsalzbelastungstest.....	59
6.2. Der Furosemidtest	61
6.3. Der orale Wasserbelastungstest	62
6.4. FGF23 und das Renin-Aldosteron-System.....	63
6.5. FGF23 und Parathormon	65
6.6. FGF23 und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	67
6.7. Ausblick.....	69
7. Quellenverzeichnis	70

8. Appendix.....	74
8.1. Probencodierung.....	74
8.2. Detaillierter Versuchsablauf, mögliche präanalytische Fehlerquellen sowie Nebenwirkungen im Versuchsverlauf.....	74
8.2.1. Der Kochsalzbelastungstest.....	75
8.2.2. Der Furosemid Test.....	75
8.2.3. Der Wasserbelastungstest	76
8.3. Probandenaufklärung.....	77
Abbildungsverzeichnis	81
Tabellenverzeichnis	83
Eidesstaatliche Versicherung	84
Danksagung	85

Abstract

Der fibroblast growth factor 23 (FGF-23) ist ein Hormon, das die Expression eines Natrium-Phosphat-Cotransporters im proximalen renalen Tubulus inhibiert und somit die Phosphatausscheidung steuern kann.

Studien zu diesem Hormon zeigten erhöhte Konzentration dieses Hormons bei Patienten mit Niereninsuffizienz genauso wie bei Patienten mit kardialen Erkrankungen und eigentlich normaler Nierenfunktion.

In dieser Probandenstudie wurden die die Effekte einer Natrium- und somit Volumenmanipulation auf die Expression von FGF23 an gesunden Individuen untersucht. An 20 Probanden zwischen 23 und 49 Jahren (im Mittel 27,3 Jahre) wurde ein Kochsalzbelastungstest, ein Furosemidtest und ein oraler Wasserbelastungstest an jeweils verschiedenen Tagen durchgeführt. Hierbei wurden zu bestimmten Zeitpunkten die FGF23 Konzentrationen neben Renin, Aldosteron, pro-AVP, pro-ANP, Parathormon und Elektrolyten im Blutserum bestimmt.

Wie zu erwarten zeigte sich im NaCl-Belastungstest eine signifikante Reduktion von Kreatinin, Harnstoff, Gesamtprotein, Kalzium, Phosphat, Aldosteron und Ct-proAVP im Serum, einhergehend mit einer Erhöhung von PTH und der Natriumkonzentration im Urin.

Die orale Wasserbelastung zeigte signifikante Konzentrationsverminderung bei Kreatinin, Harnstoff, Phosphat, Aldosteron und der Urinosmolarität.

Die Baseline FGF23 Konzentrationen waren signifikant korreliert mit Kreatinin ($r=-0,58$) und CT- proAVP ($r=0,71$). Sowohl der Kochsalzbelastungstest als auch der orale Wasserbelastungstest zeigten ein signifikantes Absinken von FGF23.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei gesunden Erwachsenen mit normaler Nierenfunktion die FGF23 Konzentrationen mit CT-proAVP korrelieren und nach einer Kochsalzbelastung deutlich supprimiert werden.

Desweiteren konnten wir in allen Versuchsaufbauten eine konstant niedrige, aber signifikante, negative Korrelation zwischen FGF23 und PTH nachweisen. Es ergab sich über alle Messwerte eine Korrelation von $r=-0,25$ mit einem hochsignifikanten $p<0,001$. Hieraus könnte man durchaus die bisher teilweise postulierten Theorien über die Hemmung von FGF23 auf Parathormon unterstützen, jedoch sehr sicher einen wie auch immer gearteten negativ-rückkoppelnden Mechanismus postulieren.

In dieser Arbeit zeigen sich also mögliche Funktionen des FGF23 über die bloße Phosphatausscheidung hinaus.

1. Einleitung

Es gibt wenig Gebiete in der Nephrologie, die in den letzten Jahren so intensiv beforscht werden wie der fibroblast growth factor 23 (FGF23). In kranken Individuen mit Störung des Knochenstoffwechsels entdeckt, folgte bald eine ganze Kaskade von Verknüpfungen dieses Hormons mit anderen Krankheitsbildern: Von Knochenstoffwechselstörungen über das Herz-Kreislauf-System, bis hin zur chronischen Niereninsuffizienz.

Schon früh wurde FGF23 mit Störungen im Phosphathaushalt, so zum Beispiel der hypophosphatämischen Rachitis in Verbindung gebracht (Riminucci et al., 2003; Yamashita, Yoshioka, & Itoh, 2000) und die biophysiologicalen Grundlagen dazu nachgewiesen (Andrukhova et al., 2012). Prinzipiell stellt FGF23 einen Faktor zur Modulation der Phosphatrückresorption über den proximalen Tubulus der Niere dar.

In der Nephrologie wird FGF23 derzeit als möglicher Prädiktor und unabhängiger Risikofaktor für den Krankheitsprogress selbst, sekundäre Erkrankungen und Mortalität bei chronisch niereninsuffizienten Patienten unter die Lupe genommen.

Auch von kardiologischer Seite gab es Untersuchungen zum Thema FGF23 und seiner Bedeutung bei der Entstehung von Atherosklerose, ventrikulärer Hypertrophie und sein Beitrag zur Erhöhung des kardiovaskulären Risikos, abhängig, sowie unabhängig von der Nierenfunktion (Ding & Ma, 2015; Faul et al., 2011; Grabner et al., 2015; Scialla et al., 2013).

Faul et al. (2011) beschreiben zum Beispiel einen Einfluss des FGF23-Spiegels auf das Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie; ein Befund, der besonders bei Hypertoniepatienten bekannt ist. Auch andere Studien weisen uns auf einen möglichen Zusammenhang zwischen FGF23 und dem Blutdrucksystem hin: Andrukhova et al. (2014) beschreiben einen Einfluss von FGF23 auf die Natriumrückresorption im distalen Tubulussystem der Niere und somit auf den Blutdruck. Weitere Studien (de Seigneux & Martin, 2016) beweisen ein besseres Ergebnis und Outcome bei der Hypertoniebehandlung mittels ACE-Hemmern bei Patienten mit erhöhten FGF23-Werten. FGF23 ist also nicht nur für unsere nephrologischen Kollegen interessant. Es scheint auch Einfluss auf Pathologien am Knochenstoffwechsel sowie am Kreislaufsystem zu haben. Über dieses spezielle Protein konnte bislang einiges an Patienten mit vielfältigen Erkrankungen erforscht werden. Über die physiologische Rolle und die Bedeutung im hormonellen Steuerungssystem beim Gesunden ist bislang nur wenig bekannt.

Viele der oben genannten, experimentellen Befunde weisen darauf hin, dass FGF23 eine Art Bindeglied zwischen dem Knochenstoffwechsel und der hormonellen Regulation des

Blutdrucks und des Salz- und Volumenhaushaltes sein könnte.

Diese Verbindung könnte man sich zu Nutze machen, um neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Hochdruck und Nierenerkrankungen zu finden.

In dieser experimentellen Arbeit wurden gesunde Probanden untersucht und in drei Versuchsaufbauten versucht, FGF23 mit Veränderungen des Salz- und Volumenhaushaltes zu beeinflussen. Zudem soll ein Bezug zwischen FGF23, der Nierenfunktion und den regulatorischen Mechanismen des Blutdrucksystems hergestellt werden.

Die Bezeichnungen „wir“ und „uns“ in dieser Arbeit bezieht sich immer auf das komplette Team des Forschungslabors der Nephrologie im Klinikum Ludwigs-Maximilians-Universität München, Standort Großhadern, meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Fischereder und meinem Betreuer Herrn Dr. M Wessely.

2. Grundlagen

In den folgenden Seiten wird ein Überblick über den bisherigen Forschungsstand zu FGF23 und seinen bekannten Wechselwirkungen gegeben.

2.1. Der Fibroblast Growth Factor 23

Der Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) ist, zusammen mit FGF19 und FGF21, ein endokrin wirkendes Hormon aus der Familie der FGFs (Itoh, Ohta & Konishi, 2015). FGF23 umfasst insgesamt 251 Aminosäuren, mit einem N-terminalen Ende von 24 Aminosäuren und einem C-terminalen Ende von 72 Aminosäuren. Das kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 12p13 und besteht aus 9386 Nukleotiden und 3 Exons, die durch 2 Introns voneinander getrennt werden. Es wirkt endokrin über sein C-terminales Ende via Bindung an alpha-Klotho. Das N-terminale Ende bindet an den FGF Rezeptor (Blau & Collins, 2015). Nach aktueller Studienlage scheint das c-terminale Ende die funktionelle Struktur zu sein (Goetz, Ohnishi et al. 2012). Die Erstbeschreibung dieses FGFs postulierte eine hohe Produktions- und Konzentrationsrate im Gehirn, genauer gesagt im ventrolateralen Thalamuskern von Mäusen (Itoh et al., 2015). Untersuchungen zu Knochenstrukturstörungen und hypophosphatämischen Krankheitsbildern, so zum Beispiel der X-chromosomalen hypophosphatämischen Rachitis oder der Osteomalazie (Tumor-induziert, sowie autosomal dominant bedingt) belegen, dass entgegen der ersten Annahmen der Großteil des FGF23 aus dem Knochen exprimiert und freigesetzt wird. FGF23 wird zum Beispiel getriggert durch erhöhte Phosphatkonzentrationen ausgeschüttet und zirkuliert anschließend systemisch.

Die Funktion von FGF23 ist eng mit seinem Korezeptor Klotho gekoppelt. Genmanipulierte Mäuse zeigen sehr ähnliche phänotypische Ausprägungen, wenn man einerseits das Gen für FGF23 und andererseits die Genexpression für Klotho hemmt. Dies zeigt sich in Hyperphosphatämie, Vitamin D Überschuss, Organatrophie oder -Dystrophie. Die aktuelle Studienlage beschreibt eine Vielzahl der möglichen Angriffspunkte, meist Klotho-vermittelt, im ganzen Körper. Nach aktueller Lehrmeinung ist FGF23 aber hauptsächlich als Faktor für die Regulation des Phosphathaushaltes zu sehen.

FGF23 inhibiert die Reabsorption von Phosphat im proximalen Tubulus der Niere. Dies geschieht über eine Regulation eines Natrium-Phosphat-Kotransporters (NaPi 2a) (Yan et al., 2005). Eine hohe Konzentration von FGF23 hat demnach ein Herunterregulieren dieses Transporters und daraus folgend eine Steigerung der Phosphatausscheidung bzw. eine Hemmung der Phosphatreabsorption zur Folge.

FGF23 hemmt die Transkription, Translation und Translokation von NaPi 2a, was zu einer verminderten Rückresorption des glomerulär filtrierten Phosphats führt. Versuche mit einer phosphatreichen Nahrung über einen längeren Zeitraum ließen umgekehrt eine Auswirkung auf den FGF23 Spiegel beobachten. Dieser Regulationsmechanismus funktioniert anscheinend langsam und reagiert nicht auf schnelle Änderung der Phosphatkonzentration (Perwad et al., 2005). Dennoch ist Phosphat ein potenter Trigger für FGF23 Expression (ebd.; Scanni, von Rotz, Jehle, Hulter & Krapf, 2014).

In der hypophosphatämischen Rachitis lässt sich auch ein Zusammenhang zwischen den phänotypischen Krankheitsbildern, FGF23 und Fehlern in dessen Gencode erkennen. Diese Fehler führen zu einer Überproduktion von FGF23 und daraus folgend zu einer hypophosphatämischen Stoffwechsellage. Studien mit Knock-out Mäusen, denen das Gen für FGF23 komplett fehlte und die somit keine endogene FGF23 Produktion besaßen, belegen umgekehrt diesen Mechanismus, indem diese Tiere eine weit erhöhte Phosphatkonzentration im Serum aufwiesen.

Diese Erkenntnisse legten nahe in FGF23 einen bis dahin noch nicht bekannten, neuen Regulator im Phosphat-Haushalt zu sehen.

Des Weiteren werden FGF23 in der aktuellen Studienlage weitere Schnittpunkte mit Hormonsystemen des Körpers zugeschrieben, die im Folgenden näher beleuchtet werden sollen.

2.2 FGF23 und die Vitamin D-Parathormon-Achse

Neben oben genannten Funktionen, hemmt FGF23 die 1-alpha-Hydroxylase in der Niere, die zur Synthese von aktivem Vitamin D3 benötigt wird und senkt dadurch dessen Spiegel, wodurch es wiederum zu einer verminderten Resorption von Phosphat und Kalzium aus dem Darmlumen kommt. Um die Kalziumkonzentration im Serum aufrecht zu erhalten, wird in den Nebenschilddrüsen die Parathormon (PTH)- Synthese gesteigert. PTH führt zu einer Aktivierung der Osteoklasten (via Osteoblasten und RANKL-Vermittlung) und dadurch zu einer Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen. FGF23 wiederum scheint die PTH Expression hemmen zu können, was in vitro Experimente zeigten. Demzufolge sind auf den Zellen der Nebenschilddrüse ebenfalls alpha-Klotho Rezeptoren zu finden, über die FGF23 Einfluss auf die PTH Synthese und Sekretion nehmen kann (Silver & Naveh-Many, 2010). Dieser Zusammenhang ist klinisch allerdings noch nicht ausreichend untersucht und bewiesen, vor allem, wenn man vor dem Problem des sekundären Hyperparathyreoidismus bei Niereninsuffizienz steht. Hier wären, wenn man von einem intakten negativen Feedback-Mechanismus zwischen FGF23 und PTH ausgeht, die gleichzeitig hohen Serum-Konzentrationen von FGF23 und PTH verwunderlich, sollten diese beiden Hormone sich doch gegenseitig regulieren. Hier wird unter anderem eine partielle Resistenz, ähnlich der peripheren Insulinresistenz bei Diabetes Mellitus Typ 2, diskutiert.

Der Zusammenhang und besonders die Regulationsmechanismen zwischen FGF23 und PTH werden immer noch kontrovers diskutiert. Eine Kopplung wäre natürlich auch über Vitamin D denkbar. Das nachfolgende Bild (Abb. 1) stammt aus der Arbeit von Blau und Collins (2015):

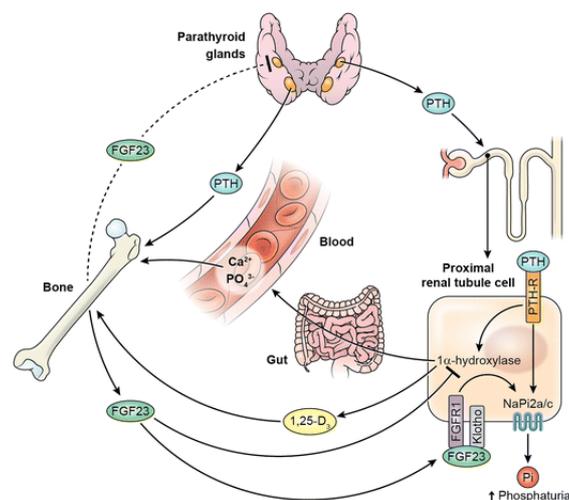


Abbildung 1: Die Vitamin D- PTH-FGF23-Achse. (Blau, J., & Collins, M., 2015).

Die Grafik demonstriert anschaulich den bisher rekonstruierten Regelkreis der so bezeichneten Vitamin D-PTH-FGF23-Achse:

FGF23 aus Osteozyten im Knochen beeinflusst über eine Koppelung an FGF-Rezeptor 1 und Klotho die Rückresorption von Phosphat in der Tubuluszelle der Niere negativ, sodass es zu einer Phosphaturie kommt. Dieser Mechanismus ist recht ähnlich zu der Koppelung des Parathormons der Nebenschilddrüse an die Parathormon Rezeptoren des Körpers. Der Unterschied ist jedoch die positiv stimulierende Wirkung des PTH auf die 1-alpha-Hydroxylase und damit die Synthese von aktivem 1,25-OH-Vitamin D3 im Gegensatz zur hemmenden Wirkung auf dieses Enzym durch FGF23. 1,25-OH-Vitamin D3 hingegen würde zu einer Aufnahme von Kalzium und Phosphat aus dem Darmlumen führen und den Aufbau von Knochengewebe fördern. Eine negative Rückkopplung, beziehungsweise Hemmung, von FGF23 auf die Sekretion von PTH ist in vitro nachweisbar, in vivo fehlt bisher jedoch der Beweis. Umgekehrt zeigten Studien (Lavi-Moshayoff, Wasserman, Meir, Silver, & Naveh-Many, 2010) eine stimulierende Wirkung von PTH auf die FGF23 Expression und die zirkulierenden Hormonspiegel.

Und auch für Vitamin D (1,25-OH-Vitamin D3) konnte eine stimulierende Wirkung auf die FGF23 Synthese durch Transkriptionserhöhung durch einen Vitamin D Rezeptor (VDR) an der Promotorregion des FGF23 nachgewiesen werden. Somit bilden diese beiden Hormone schon alleine unter sich einen Regelkreis aus (Liu, Tang et al. 2006).

2.3. FGF23 in der Niereninsuffizienz

Im Verlauf einer progredienten Nierenfunktionsstörung, bis hin zu einer terminalen Niereninsuffizienz, lassen sich steigende FGF23 Werte beobachten. Das steigenden FGF23 ist eng mit den steigenden Kreatininwerten korreliert. Eine fortschreitende Niereninsuffizienz mit steigenden Kreatininwerten korreliert demnach also mit der steigenden FGF23 Konzentration (Larsson, Nisbeth et al. 2003).

Die FGF23-Konzentration steigt im Vergleich zu PTH (im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus) allerdings schon deutlich früher an, bis sie, in der terminalen Niereninsuffizienz, ein teilweise Hundertfaches des Normwertes erreichen kann.

Auch hier sind Genese, Auswirkungen und Bedeutung dieser deutlich erhöhten Werte Gegenstand aktueller Forschung. Hier wird zum einen eine Suppression des Kofaktors Klotho beobachtet die wiederum regulativ-erhöhte FGF23-Konzentrationen bewirken könnte.

Eine weitere These zum Konzentrationsanstieg des FGF23 stützt sich wieder auf die oben dargestellte Verbindung zwischen FGF23, 1,25-OH-Vitamin D3 und dem Parathormon.

Eine abnehmende Nierenfunktion führt hier unter anderem über die gestörte und verminderte GFR und tubuläre Sekretion zu einer Phosphatretention.

Eine höhere Phosphatkonzentration würde nun eine vermehrte FGF23 Expression triggern, um zusätzliche Phosphatrückresorption über die Niere zu vermeiden. Somit wären die teils exorbitanten FGF23 Spiegel bei terminal niereninsuffizienten Patienten zumindest partiell nachvollziehbar.

Wenn man den oben dargestellten Regelkreis postuliert, würde eine erhöhte FGF23 Konzentration als Gegenspieler auch eine verminderte 1,25-OH-Vitamin D₃ Synthese und somit einen Vitamin D Mangel erzeugen. Aufgrund dieses Mangels würde die Phosphatresorption über den Magen-Darm-Trakt deutlich vermindert, was wiederum zu einer Aktivierung und vermehrten Expression von Parathormon führen würde. Die Entwicklung des sekundären Hyperparathyreoidismus wäre die Konsequenz. Die Phosphatabhängigkeit dieser Parameter konnte auch in einer Studie gezeigt werden, die gezielt die Auswirkung von Phosphatbindern untersuchte (Block, Wheeler et al. 2012). Hierbei blieben die PTH Werte stabil und die Vitamin D Konzentrationen zeigten sich deutlich reduziert. Lediglich bei FGF23 zeigte diese Studie präparatabhängig-divergente Ergebnisse.

Eine weitere Theorie für die Entstehung der hohen FGF23 Werte ist ebenfalls die verminderte FGF23 Ausscheidung bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Zumindest konnten Larsson, Nisbeth et al. (2003) eine FGF23-Ausscheidung sowohl bei gesunden Probanden als auch eine deutlich erhöhte Ausscheidung bei Personen mit eingeschränkter Nierenfunktion und Restausscheidung, und erhöhten FGF23 Spiegeln nachweisen.

Weitere Theorien betreffen z.B. eine chronische Erhöhung der Entzündungsmediatoren bei chronisch niereninsuffizienten Patienten, die wiederum eine FGF23 Expression fördern.

2.4. FGF23 und das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)

Ein weiterer Bestandteil der Forschung bei niereninsuffizienten Patienten bildet das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Dieses reguliert über komplexe Verschaltungen direkt und indirekt den menschlichen Blutdruck. Seine Bedeutung in der Nephrologie bei Niereninsuffizienz kommt auch bei der therapeutischen Reduzierung der Proteinurie zur Geltung.

Eine Inhibierung des RAAS und somit eine Verringerung des Filtrationsdrucks wirkt einer erhöhten Proteinurie und somit weiterer Schädigung des Glomerolums, entgegen.

Deshalb sind seit Langem Medikamente, die das RAAS blockieren, sogenannte ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer), fester Bestandteil der Therapie des nephrotischen Syndroms.

Studien zu Vitamin D und Niereninsuffizienz legen nahe, dass es einen Einfluss von Vitamin D auf das RAAS im Sinne einer Herunterregulierung desselben gibt. So nimmt Calcitriol wohl direkten Einfluss auf die Expression von Renin über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) (Li, Kong et al. 2002).

Es gibt ebenfalls Studien, die einen Einfluss des RAAS auf die oben beschriebene Vitamin D- PTH- FGF23 Achse zeigen (de Borst, Vervloet et al. 2011).

Studien zum Vitamin-D-Haushalt bei chronischer Niereninsuffizienz legen nahe, dass Vitamin-D- Mangel in einer Überaktivierung des RAAS mündet und somit zum einen das Fortschreiten der Niereninsuffizienz fördert und zum anderen das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht.

Andererseits konnten Studien belegen, dass Angiotensin II über eine ATI-Rezeptor vermittelte Wirkung die renale Klotho Expression verringern kann (Yoon, Ghee et al. 2011). Diese Wirkung konnte im Test durch das Medikament Losartan, einen AT1-Blocker, aufgehoben werden (de Seigneux and Martin). Hier ist der genaue Mechanismus allerdings noch nicht vollständig verstanden. So könnte auch durch ATII induzierter oxidativer Stress (über das NADPH Oxidase-System) eine Rolle spielen.

Besonders bei Dialysepatienten geht ein erhöhter FGF23-Spiegel in Kombination mit einem Vitamin-D-Mangel mit einer schlechten Prognose einher. Dies ist unter anderem mit der Aktivierung des RAAS begründet. Denn das ACE II wird von FGF23 supprimiert. Es folgt darauf ein verringerter Abbau von Angiotensin und somit eine Verstärkung und prolongierte Wirkung der RAAS Kaskade. Ein weiterer Faktor ist die FGF23 assoziierte Kalzium- und Natriumretention. Dies geschieht vornehmlich über einen Natrium-Chlorid-Kotransporter und den TRPV5 Kanal, FGF23 beeinflusst und hochreguliert (Andrukhova, Slavic et al. 2014, Andrukhova, Smorodchenko et al. 2014). Diese Effekte führen zur konsekutiven Volumenretention und verstärken dadurch die Hypertonie.

2.5. Die Regulation des Salz- und Volumenhaushalts im Menschen

Zirka 60 % des Körpergewichtes eines Erwachsenen ist Wasser. 66% davon befindet sich in den Körperzellen, dem Intrazellularraum. Nur etwa ein Drittel des Wassers im Körper ist extrazellulär.

Der Volumenhaushalt des Menschen wird über verschiedene komplexe Systeme geregelt. Hierbei ist es wichtig zu verstehen, dass der Flüssigkeitshaushalt nicht primär durch die Regulation der Wassermenge erfolgt, sondern die Homöostase durch Absorption, Ausscheidung und Verschiebung von Salzen, insbesondere Natrium erfolgt und das Wasser dadurch sekundär über osmotische Prinzipien reguliert wird. Während sich Wassermoleküle im gesamten Körper durch Diffusion frei bewegen können, existieren in den Zellmembranen Transportproteine und Kanäle für den Transport von Ionen. Die Bewegung und Verteilung von Ionen wird also reguliert und benötigt immer eine gewisse Art von Energie, sei es über aktiv angetriebenen Transport mittels ATP-verbrauchenden Transportproteinen oder zumindest entlang eines Konzentrationsgradienten, der allerdings seinerseits auch energiereich aufrechterhalten werden muss. Das Wasser folgt also insgesamt der Verteilung der Salze, angetrieben vom osmotischen Druck.

2.6. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das wohl bedeutendste System zur Blutdruckregulation im menschlichen Körper stellt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) dar.

Die Protease Renin wird durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Blutdruckabfall, verminderte Nierendurchblutung oder auch Katecholamine getriggert. Sie wird am juxtaglomerulären Apparat der Niere ausgeschüttet und gelangt so in die Blutbahn. Renin spaltet das von der Leber gebildete Angiotensinogen zu Angiotensin I. Dieses wird wiederum in der Lunge durch die Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Dieses Protein wirkt direkt an der Gefäßmuskulatur und initiiert eine Vasokonstriktion. Daneben wird Aldosteron aus der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde freigesetzt. Aldosteron wirkt über Aktivierung einer Natrium-Kalium-ATPase im distalen Tubulus und führt zu einer vermehrten Kaliumausscheidung und Natrium Reabsorption. Durch diese Natriumretention wird zudem mehr Volumen im Körper zurückgehalten.

Beide Mechanismen, zum einen die direkte vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II, zum anderen die Natrium- und damit Volumenretention durch Aldosteron, erhöhen den Blutdruck.

Natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) haben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System entgegengesetzte Wirkung. ANP wird vor allem im linken Vorhof und Herzohr bei vermehrter Volumenbelastung des linken Herzens freigesetzt. An der Niere erhöht das ANP durch seine vasodilatatorische Wirkung den renalen Blutdurchfluss und somit die GFR. Ebenfalls verringert es über eine cGMP vermittelte Rückkopplung die Natriumrückesorption am distalen Konvolut und in den Sammelrohren. Eine gesteigerte Natriumfiltration- und Ausscheidung ist die Folge. Darüber hinaus drosselt ANP die Reninsekretion. ANP wirkt endokrin als Gegenspieler zu Aldosteron.

2.7. Das antidiuretische Hormon ADH (Vasopressin)

Ein weiteres Hormon, das den menschlichen Volumenhaushalt reguliert, ist das aus nur neun Aminosäuren bestehende antidiuretische Hormon ADH. ADH wird in den Nuclei supraopticus und paraventricularis exprimiert. Es wird aus einem gemeinsamen 143 Aminosäuren langen Prohormon zusammen mit Neurophysin II und Copeptin (Ct-proAVP) freigesetzt. Letzteres wird derzeit als stabiles ADH Äquivalent in der laborchemischen Diagnostik verwendet.

Copeptin (Carboxy-terminales-pro Arginin Vasopressin, CT-proAVP) besteht aus 39 Aminosäuren und wird, wie oben beschrieben, aus dem Prohormon in äquimolaren Mengen mit ADH freigesetzt; Also entspricht die Copeptin-Sekretion der Sekretion des antidiuretischen Hormons AHD.

In der Diagnostik des Polyurie-Polydipsie-Syndroms wurde bisher neben der Analyse von Serum- sowie Urin-Osmolalität die Bestimmung von Vasopressin (ADH/AVP) als Methode der Wahl genutzt. Allerdings ist die diagnostische Aussagekraft von Vasopressin durch seine Bindung an Thrombozyten, die strikte Einhaltung präanalytischer Vorgaben (EDTA-Plasma/ rasche Zentrifugation,/nur bei -20 °C stabil) und zeitaufwändige, komplizierte Analytik, begrenzt.

Copeptin ist als Biomarker dem ADH aufgrund seiner Halbwertszeit von bis zu sieben Tagen und der Stabilität sowohl im Vollblut, als auch im Serum, sowie der unkomplizierteren präanalytischen Handhabung, in der laborchemischen Diagnostik überlegen. Das synthetisierte Hormon AHD wird über den Tractus supraoptico-hypophysialis zum Hypophysenhinterlappen transportiert, dort gespeichert und bei Bedarf in die Blutbahn sezerniert.

Ursächlich für eine vermehrte Ausschüttung von ADH sind Signale von Osmorezeptoren des Hypothalamus, ebenso wie ein Volumenmangel im arterio-venösen System, der über Barorezeptoren des rechten Vorhofes und im Aortenbogen registriert wird. Bei Volumenmangel oder Anstieg der Osmolarität (Konzentrationssteigerung von Blutsalzen) wird also vermehrt ADH ausgeschüttet.

ADH reguliert die Wasserrückresorption in den Sammelrohren der Niere über Bindung an V2-Rezeptoren und cAMP vermittelte Steigerung der Translation von Aquaporinen (AQP2). Über die Aquaporine in der luminalen Zellmembran der Epithelzellen wird osmotisch Wasser und Harnstoff aus dem Primärharn resorbiert und über die dorsolaterale Zellmembran in die Blutbahn abgegeben. So Erhöht sich das intravasale Volumen wieder. Über V1 Rezeptoren an der Zellwand der Arterien und Arteriolen wirkt ADH in höheren Konzentrationen außerdem vasokonstriktorisch, weswegen es unter anderem auch als Vasopressin bekannt ist.

Der Ausfall der ADH-Produktion führt zum Krankheitsbild des Diabetes insipidus, durch deutlich eingeschränkte Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn. Eine Überproduktion des ADH führt dagegen zum Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SI-ADH).

3. Fragestellung

Aus den eingangs erwähnten Beobachtungen des möglichen Zusammenhangs von FGF23 mit der Regulation des Volumen- und Salzhaushalts des Menschen stellten sich im Grunde drei wesentliche Forschungsfragen:

- Kann man den FGF23-Spiegel im gesunden Probanden von außen durch Veränderungen des Volumenhaushalts beeinflussen?
- Wie verhält sich FGF23 in gesunden Probanden, wenn man Elektrolyte und Volumen variiert?
- Wie verhält sich FGF23 diesbezüglich im Vergleich mit anderen volumenregulierenden Hormonen?

4. Methoden

Dieses Kapitel geht auf die Methoden ein, die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen sind, um die Forschungsfragen so gut wie möglich zu beantworten.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Versuche, die Probandengruppe, die Methodik sowie Statistik und jeweils mögliche Fehlerquellen eingegangen.

4.1. Testverfahren

In diesem Abschnitt werden die drei durchgeführten Testverfahren beschrieben.

Neben den in dieser Arbeit beschriebenen drei Experimenten waren noch 3 weitere Versuchsaufbauten geplant und auch von der Ethikkommission der LMU bewilligt. Letztere wurden aber aufgrund von Zeit- und Finanzierungsmangel vorerst ausgesetzt.

Jeder Proband erhielt vor Versuchsbeginn einen detaillierten Aufklärungsbogen, der Vorgehensweisen, Ziele und mögliche Risiken der Studie darlegte. Diese in im Anhand angefügt. Durchgeführt wurden der Kochsalzbelastungstest, der Furosemidtest (Lasix-Belastungstest) und der orale Wasserbelastungstest. Auf die Durchführung eines Desmopressinversuchs, eines Wasserimmersionsversuchs und eines Durstversuchs wurde wie oben angegeben verzichtet.

4.1.1. Der Kochsalzbelastungstest

Der Kochsalzbelastungstest wird klinisch bei Verdacht auf einen primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) verwendet. Beim Conn-Syndrom wird vermehrt Aldosteron ausgeschüttet und hierdurch die Natriumrückresorption deutlich erhöht.

Bei einem Kochsalzbelastungstest würde physiologisch die Aldosteronproduktion durch die rasche und synchroner Natriumerhöhung über verminderte Reninausschüttung supprimiert. Physiologisch wäre ein Adosteronkonzentrationsabfall auf unter 50% des Ausgangswertes zu erwarten.

Bei einer autonomen Aldosteronproduktion wie beim Conn-Syndrom wäre dieses negative Feedback nicht erhalten. Dies kann z.B. durch einen aldosteronproduzierenden Tumor der Nebennierenrinde der Fall sein. Das Aldosteron sorgt an der Niere, wie oben beschrieben, zu einer vermehrten Natriumrückresorption und konsekutiven Hypervolämie, die in eine oft therapieresistente Hypertonie mündet. Das Conn-Syndrom ist die wohl häufigste Ursache für eine sekundäre Hypervolämie.

Im Kochsalzbelastungstest wird durch Infusion von 2 Litern einer isotonen Kochsalzlösung über eine Zeitspanne von vier Stunden beim Gesunden eine Suppression des Renin-Aldosteronsystems durch das Überangebot an Volumen und Kochsalz erreicht. Zu erwarten ist hier eine Senkung des Aldosterons um mindestens 50% des Wertes. Bei Patienten mit Conn-Syndrom, also einem primären Hyperaldosteronismus durch einen Aldosteron-produzierendem Tumor bleibt diese Suppression aus. Der Aldosteronspiegel wird durch den Test in diesem Fall kaum oder gar nicht beeinflusst.

4.1.2. Der orale Wasserbelastungstest

Der Wasserbelastungstest wird als ADH-Suppressionstest zur unterstützenden Diagnostik bei Verdacht auf ein SIADH (Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion /Schwartz-Bartter-Syndrom) genutzt. Das Schwartz-Bartter-Syndrom ist eine Störung der Volumenregulation, bei der es durch eine pathologisch erhöhte Sekretion von antidiuretischem Hormon (ADH/ Vasopressin) zu einer Retention von Wasser und konsekutiv einer verdünnungsbedingten Hyponatriämie kommt. Sehr häufig tritt das Schwartz-Bartter-Syndrom als paraneoplastisches Syndrom im Rahmen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms auf. Zu dem Symptomenkreis zählen neben der laborchemisch manifesten Hyponatriämie, auch allgemeine unspezifische Symptome, wie Übelkeit, Kopfschmerzen, Inappetenz und Krampfanfälle. Zur Diagnostik gehört der ADH-Suppressionstest durch orale Wasserbelastung. Hierbei trinken die Probanden eine festgesetzte Menge von 20ml Leitungswasser pro Kilogramm Körpergewicht in 15-20 min. Die normale Wasserausscheidung beim Gesunden beträgt nach 4-5 Stunden ca. 80% der aufgenommenen Flüssigkeit. Die Urinosmolalität sinkt hierbei im Normalfall zumindest bei einer Stichprobe deutlich ab, da der Urin durch das Wasserüberangebot und die ADH-Suppression weniger konzentriert ausgeschieden wird ($<100\text{mosmol/kg}$ /Spez. Gewicht $< 1005\text{ g/ml}$).

Patienten mit einer inadäquaten ADH Sekretion scheiden dagegen oft nur bis zu 40% der zugeführten Flüssigkeitsmenge aus. die Urin-Osmolalität bleibt über 100 mOsmol/kg , die ADH-Konzentration ist nach 90 oder 120 Minuten nicht supprimiert. Bei bereits pathologischen Natriumwerten kann bei diesem Versuch eine Hyponatriämie durch weitere Verdünnung verschlimmert werden.

4.1.3. Der Furosemidtest (Renin-Aldosteron-Stimulationstest)

Der Furosemidtest wird bei differenzialdiagnostischer Abklärung einer arteriellen Hypertonie angewendet, besonders bei Verdacht auf eine Störung des Renin-Aldosteronsystems. Hierbei werden der Versuchsperson, nach Abnahme der Basalwerte aus dem Blut, 40mg Furosemid intravenös verabreicht. Furosemid ist ein Schleifendiuretikum, das ein Natrium-Kalium-2 Chlorid Kotransporter in der aufsteigenden Henle-Schleife des Nephrons hemmt und über vermehrte Ausscheidung von Natrium die Diurese induziert. Durch den Verlust von Natriumionen und Volumen wird das Renin-Aldosteron-System aktiviert und es kommt in Folge zu einer vermehrten Ausschüttung beider Hormone. Als physiologisch wird hierbei ein zwei- bis sechsfacher Anstieg der basalen Konzentrationen von Renin und Aldosteron gewertet.

Ein primärer Hyperaldosteronismus würde mit einem niedrigen Basalwert von Renin und nur geringem Anstieg nach Furosemidbelastung und hohen Ausgangswerten für Aldosteron und konsekutivem Abfall nach Belastung einhergehen. Abzugrenzen ist hiervon der sekundäre Hyperaldosteronismus, bei dem die anfangs niedrigen Werte für Renin nach Applikation des Medikaments ansteigen und die bereits hohen Aldosteronwerte noch weiter ansteigen würden. Ein Anstieg beider Hormone bis zum 4-fachen der Basalwerte, kann man bei Essenzieller Hypertonie beobachten. Ein bis zu 10-facher Anstieg beider Werte zeigt sich bei einer Nierenarterienstenose.

4.2. Studiendesign

Die Studie wurde als experimentelle, prospektive Studie an einer kleinen Gruppe freiwilliger, gesunder Probanden geplant und durchgeführt. Sämtliche zu untersuchenden Parameter wurden von vornherein festgelegt und eine Probandenzahl von 20 Personen zur statistisch signifikanten Auswertung definiert. Auf die einzelnen Parameter und deren Bedeutung wird in der folgenden Arbeit noch genauer eingegangen. Da es sich um eine experimentelle Studie an gesunden Probanden handelte, wurde der Rat des Ethikkommission der LMU München eingeholt. Nach kleineren Nachbesserungen am Aufklärungsbogen wurde die Versuchsreihe bewilligt.

4.3. Testgruppe und Durchführung

Zur Beurteilung des Zusammenhangs von FGF23 mit der hormonellen Regulation des Salz- und Volumenhaushalts wurden bei 20 gesunden Probanden, im Alter von 23 bis 49 Jahren (Durchschnittsalter: 27,3 Jahre), elf männlichen und neun weiblichen, verschiedene klinische Tests durchgeführt. Die Versuchspersonen wurden aus dem Feld der ärztlichen Mitarbeiter der nephrologischen Abteilung des Klinikums Großhadern, sowie aus dem Freundes- und Bekanntenkreis des Autors rekrutiert. Es wurde explizit Wert auf gesunde Probanden gelegt, um eine möglichst unverfälschte Physiologie darzustellen.

Die Probanden mussten zwischen 18 und 60 Jahre alt sein und durften keine relevanten Erkrankungen, insbesondere keine Herz-Kreislaufkrankungen oder Erkrankungen des Knochenstoffwechsels aufweisen und keine Medikamente einnehmen, die Herz-Kreislauf-System oder Knochenstoffwechsel beeinflussen könnten. Ebenso durfte keine akute Infektion zum Versuchszeitpunkt vorliegen.

Die extern rekrutierten Probanden erhielten für die an drei Tagen jeweils 4,5 Stunden stattfindenden Versuche eine Aufwandsentschädigung von kumuliert 100 Euro, die aus dem durch Drittmittel gestellten Versuchsbudget entnommen wurden.

Die Probanden unterzeichneten die im Anhang angefügte Probandenerklärung nach dem mündlichen Hinweis, dass nur drei der angeführten sechs Versuche durchgeführt würden, nämlich der Kochsalzbelastungstest, eine forcierte Diurese mit 20mg Furosemid und eine orale Belastung mit Leitungswasser.

Die Probanden mussten zur Versuchsdurchführung mindestens acht Stunden nüchtern sein, sowie in den letzten 12 Stunden auf Kaffee und Nikotin verzichtet haben. Eingangs wurde eine Urinprobe gewonnen, die im besten Fall den Morgenurin darstellte. Eine eigenverantwortliche Gewinnung durch die Probanden am Wohnort stellte sich meist logistisch als unmöglich dar. Die Versuche wurden stets zwischen 7:00 Uhr oder 8:00 Uhr morgens begonnen. Die Reihenfolge der Versuchstage richtete sich nicht nach einem festen Schema, sondern orientierte sich an der zeitlichen Verfügbarkeit der Probanden, wobei ein Mindestabstand zwischen den Versuchen von 24 Stunden eingehalten wurde. Jeder Versuch lief über vier Stunden mit jeweils vier Blutentnahmen zu den Zeitpunkten Null, eine Stunde, zwei und vier Stunden nach Versuchsbeginn. Zusätzlich wurde in dieser Zeit auch ein Sammelurin gewonnen.

Verwendet wurden pro Blutabnahme jeweils zwei 7,5 ml Serumröhrchen, sowie zwei 3,5 ml EDTA-Plasma Röhrchen. Nach der Abnahme wurden die Röhrchen in einer Zentrifuge 10 min. bei 4°C abzentrifugiert und die EDTA-Plasmaanteile, sowie die Serumanteile säuberlich in voretikettierte Eppendorfgefäße umpipettiert; der Zellüberstand wurde verworfen. Hierbei wurde insbesondere der EDTA-Plasma Anteil in Aliquots zu je 200µl nach den Herstellervorgaben des FGF23 ELISA Testkits aufgeteilt.

Die fertig befüllten Eppendorfgefäße wurden danach umgehend bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

Dabei wurde darauf geachtet die Verweildauer in Raumtemperatur so gering wie möglich zu halten, um möglichst unverfälschte Daten erheben zu können.

Die abgenommenen Serumproben wurden sofort nach Abnahme über das hauseigene Rohrpostsystem in die Abteilung der klinischen Chemie des Klinikums Großhadern verschickt. Ebenso die Urinprobe vor Versuchsbeginn und die Probe aus dem Sammelurin nach Versuchsende.

4.4. Bestimmung der Werte

Bei allen Versuchen wurden die Konzentration von Elektrolyten und Retentionswerten zu den jeweiligen Zeitpunkten im Serum, sowie vor und nach den Versuchen im Urin bestimmt. Es handelt sich hier um Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Phosphat, Kreatinin, Eiweiß, und Harnstoff. Der gesammelte Urin wurde auf seine Menge, Osmolalität, und die Konzentration von Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Kreatinin und Phosphat untersucht. FGF23 wurde aus einem der Plasma Aliquots mit einem c-terminalen Elisa (IMMUTOPICS INC.) von Mitarbeitern des Klinischen Forschungslabors der Nephrologie in Großhadern bestimmt. Zusätzlich verglichen wir jeweils die Anfangs- und Endproben bezüglich Renin, Aldosteron, proANP, proAVP und PTH beim Kochsalzbelastungstest und beim Furosemidtest.

Die Bestimmungen von Renin und Aldosteron wurden freundlicherweise von endokrinologischen Speziallabor der LMU München Standort Innenstadt unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. M. Bidlingmaier durchgeführt. Die Messungen von iPTH, CT-pro-AVP und proANP wurden vom Referenzlabor Limbach in Heidelberg durchgeführt. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde mit Hilfe der CKD-EPI Formel geschätzt. Diese Methode gilt zum heutigen Zeitpunkt als die genaueste Schätzung der GFR. Diese Formel wurde von einer Forschergruppe des NIDDKD (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease) entwickelt und an einem Kollektiv von 3896 Teilnehmern validiert (Levey et al., 2009).

Diese Validierung zeigte für die CKD-EPI-Formel genauere Übereinstimmungen mit der wahren GFR; In Bereichen über 60 ml/min lag die Abweichung zwischen gemessener und geschätzter GFR mit CKD-EPI bei 2,5 gegenüber 5,5 ml/min/1,73 m² mit MDRD (Levey & Stevens, 2010). Für die Bestimmung von FGF23 wurde ein c-terminales ELISA Testkit von Immutopics verwendet. Die gewonnenen EDTA Proben der Probanden wurden aufgrund der kurzen Halbwertszeit von FGF23 von etwas unter einer Stunde so zeitnah wie möglich zentrifugiert und das gewonnene Plasma in Portionen von je 200µl tiefgefroren. Der Zellüberstand wurde verworfen.

Die abgenommenen Serumproben wurden sofort nach Abnahme über das hauseigene Rohrpostsystem in die Abteilung der klinischen Chemie des Klinikums Großhadern verschickt. Ebenso die Urinprobe vor Versuchsbeginn und die Probe aus dem Sammelurin nach Versuchsende.

Cockcroft-Gault-Formel:

$$\text{Kreatinin-Clearance [ml/min]} = \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht}}{72 \times \text{Serum-Kreatinin}} \times [0,85 \text{ bei Frauen}]$$

MDRD-Formel:

$$\text{eGFR [ml/min/1,73 m}^2] = 175 \times \text{Serum-Kreatinin [mg/dl]}^{-1,154} \times \text{Alter}^{-0,203} \times [0,742 \text{ bei Frauen}]$$

CKD-EPI-Formel:

Geschlecht	Serum-Kreatinin [mg/dl]	eGFR-Berechnung [ml/min/1,73 m ²]
weiblich	≤ 0,7	GFR = 144 x (Serum-Kreatinin/0,7) ^{-0,329} x (0,993) ^{Alter}
weiblich	> 0,7	GFR = 144 x (Serum-Kreatinin/0,7) ^{-1,209} x (0,993) ^{Alter}
männlich	≤ 0,9	GFR = 141 x (Serum-Kreatinin/0,9) ^{-0,411} x (0,993) ^{Alter}
männlich	> 0,9	GFR = 141 x (Serum-Kreatinin/0,9) ^{-1,209} x (0,993) ^{Alter}

Abbildung 2. Übersicht der Möglichkeiten der GFR Berechnung (Wendt, 2019)

4.5. Erstellung einer Datenbank

Die erhaltenen Werte wurden in eine eigens erstellte Exceltabelle an den vorhandenen Rechnern der nephrologischen Abteilung der LMU München Standort Großhadern eingetragen.

Hierbei wurde eine Sortierungsmöglichkeit implementiert, die die Suche und Differenzierung nach Einzelprobanden, Versuchsart und Abnahmezeitpunkt ermöglicht. So konnten die nachfolgenden Berechnungen so exakt und ausführlich wie möglich gestaltet werden.

4.6. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und Grafiken wurden, wenn nicht anders angegeben, mittels SPSS v. 22. und Microsoft Excel 2013 (360) erstellt. Für die Berechnung der einzelnen Korrelation zwischen den bewerteten Parametern wurde ein Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet, und die Signifikanz mittels verbundenem T-Test ermittelt. Vor der Auswertung wurden aufgrund der spezifischen laborchemischen Nachweisgrenzen Aldosteronwerte < 35 (pg/ml) auf 34,9 (pg/ml) und Reninwerte < 2 (μ U/ml) auf 1,9 (μ U/ml) gesetzt, um eine möglichst scharfe und kritische Grenze zu bilden.

5. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse des experimentellen Designs zusammengefasst.

5.1. Allgemeine Ergebnisse

Die Versuchspersonengruppe bestand aus 20 gesunden Probanden, im Alter von 23 bis 49 Jahren (Durchschnittsalter: 27,3 Jahre), elf männlichen (55%) und neun weiblichen (45%). Bei der Bestimmung der FGF23 Basiswerte konnte eine interindividuelle Schwankung von einem Minimum 33,81(RU/ml) zu einem Maximum von 324,219 (RU/ml) und einem insgesamten Mittelwert von 81,838 (RU/ml) feststellen. Bei gesunden Erwachsenen liegen die Basiswerte nach aktueller Forschung zwischen 22 und 91 RU/ml.

Sowohl das Experiment 1, die Kochsalzinfusion, sowie das Experiment 2, der orale Wasserbelastungstest, senkte den FGF23 Spiegel signifikant. Eine Probandin fiel mit besonders erhöhten Basiswerten (max. 324, 219 RU/ml) auf. Diese zeigten sich über die Versuchstage konstant hoch und auch von den intraexperimentellen Veränderungen ohne Abweichung von den restlichen Werten, sodass diese mit in die Rechnungen miteinbezogen wurden. Ohne Berücksichtigung dieser hohen Werte liegt der Mittelwert aller Basis FGF23 Werte bei 69 RU/ml (min. 33,81, max. 150,91). Beide Mittelwerte, sowohl korrigiert als auch unkorrigiert liegen im Bereich des bisher bekannten Rahmens für gesunde Personen.

Der Blutdruck der Probanden lag im Normbereich, im Mittel 87mmHg diastolisch zu 118mmHg systolisch. Der mittlere Kreatininwert vor den Experimenten lag bei 1 (min. 0,6 max. 1.1) (mg/dl).

Eine physiologische positive Korrelation zwischen FGF23 und dem Serumphosphat, sowie eine negative Korrelation zwischen FGF23 und dem Phosphat im Urin konnten berechnet werden, was die nachfolgende Tabelle verdeutlicht.

Tabelle 1. Korrelation von FGF23 mit den Baseline- Serum- sowie Urinphosphatkonzentration über alle Versuchsaufbauten

		FGF-23	P04-	UP04-
FGF-23	Korrelation nach Pearson	1	,271**	-,041
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,675
	N	223	223	109
P04-	Korrelation nach Pearson	,271**	1	,112
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,247
	N	223	223	109
UP04-	Korrelation nach Pearson	-,041	,112	1
	Signifikanz (2-seitig)	,675	,247	
	N	109	109	109

Im folgenden Teil wird auf die Ergebnisse der einzelnen Versuchsaufbauten eingegangen.

5.2. Der Kochsalzbelastungstest

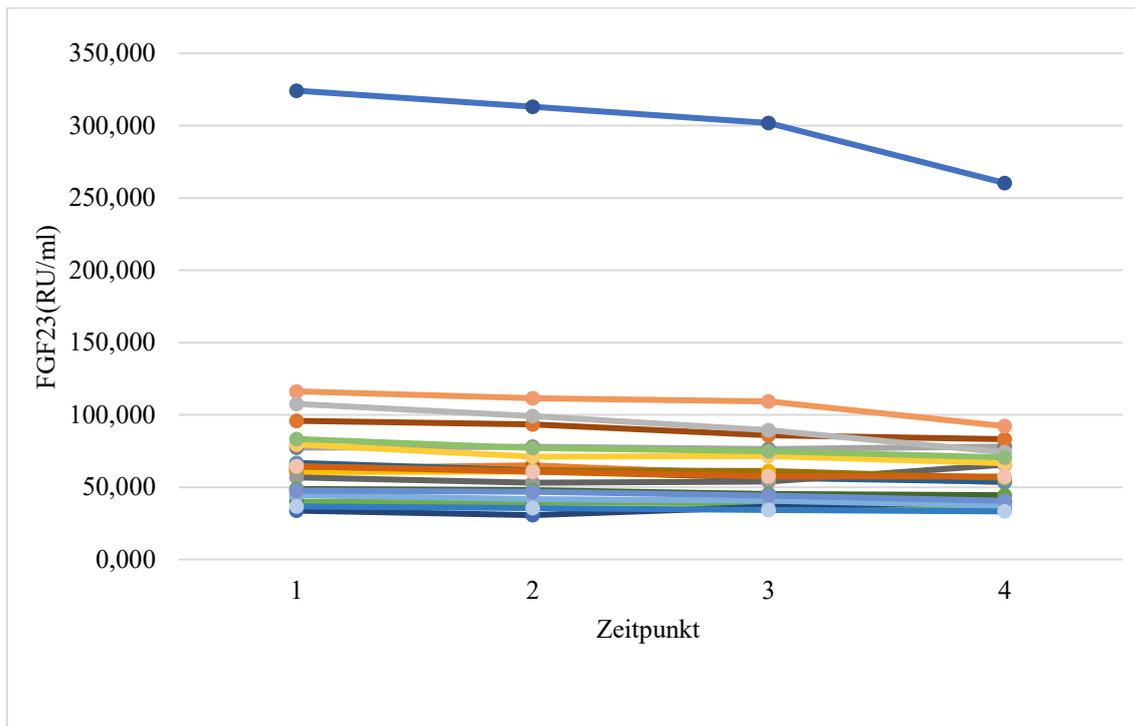


Abbildung 3. Übersicht der einzelnen Verläufe der FGF23 Konzentration während des Kochsalzbelastungstests.

Im klinischen Kochsalzbelastungstest kommt es nach einer Infusion von 2l NaCl über zwei Stunden zu einer Suppression des RAAS und somit zu einer Senkung der Serumkonzentrationen der einzelnen Hormone. Im gesunden ist eine Senkung des Aldosterons von mindestens 50% normal.

Die NaCl-Infusion induziert hier die ebenfalls erwartete Suppression von Renin (um 66,66%, von 18,6 auf 6,2 (μ U/ml), $p < 0,001$) und Aldosteron (um 62,5%, von 141,91 auf 53,22 (pg/ml), $p < 0,001$) Ferner war ein Abfall der Gesamtproteinkonzentration um 11,26% (von 7,1 (g/dl) auf 6,3 (g /dl)) zu beobachten.

Abbildung 3. zeigt den Verlauf von FGF23 aller Probanden während des der Kochsalzbelastung. Der generelle Trend zeigt eine Abnahme des FGF23 Spiegels während dieses Versuches. Im Mittel von 78,64(RU/ml) (min. 33,81(RU/ml), max. 324,219(RU/ml)) auf 67,672 (RU/ml) (min. 33,241(RU/ml); max. 260,254 (RU/ml)), also im Schnitt um 13,94% des Ausgangswertes (vgl. Abb. 4 und 5).

Eine genaue Aufstellung bietet Tabelle 2.

Tabelle 2. Mittelwertvergleich vor Versuchsbeginn (Vor NaCl, Zeitpunkt 1) und nach Versuchsende (Nach NaCl, Zeitpunkt 4), mit den dazugehörigen p-Werten im Kochsalzbelastungstest.

Parameter	Vor NaCl	Nach NaCl	p
Gesamtprotein mg/dl	7,1 (0,6)	6,3 (0,6)	<0,001
Kalzium mmol/l	2,28 (0,13)	2,0 (0,11)	<0,001
Phosphat mg/dl	3,74 (0,65)	3,26 (0,48)	<0,001
Kreatinin mg/dl	0,98 (0,14)	0,90 (0,16)	<0,001
Harnstoff mg/dl	33,0 (11,9)	28,6 (11,2)	<0,001
Urin Osmolalität mosm	787 (190)	677 (243)	0,057
CT-proAVP pmol/L	4,8 (2,0)	3,7 (1,4)	0,006
iPTH pg/ml	37,1 (8,8)	51,6 (20)	0,019
FGF23 RU/ml	78,6 (62)	67,7 (48)	0,005

Tabelle 2 zeigt die deutlich signifikanten Konzentrationsgefälle einiger abgenommener Parameter. Während der NaCl-Infusion zeigt sich iPTH induziert, über alle weiteren Parameter ein deutliches Konzentrationsgefälle.

Im Folgenden werden die Verläufe der Parameter Renin, Aldosteron und Natrium näher erläutert. Die Abbildungen 4. bis 7. sowie die dazugehörigen Tabellen 3. und 4. zeigen die Verläufe von Renin und Aldosteron. Wie bei einer Volumenbelastung zu erwarten, reagiert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bei einer Volumen- bzw. Druckerhöhung mit einer Aktivitätsminderung, was sich hier recht deutlich in den sinkenden Konzentrationen für Renin und Aldosteron widerspiegelt.

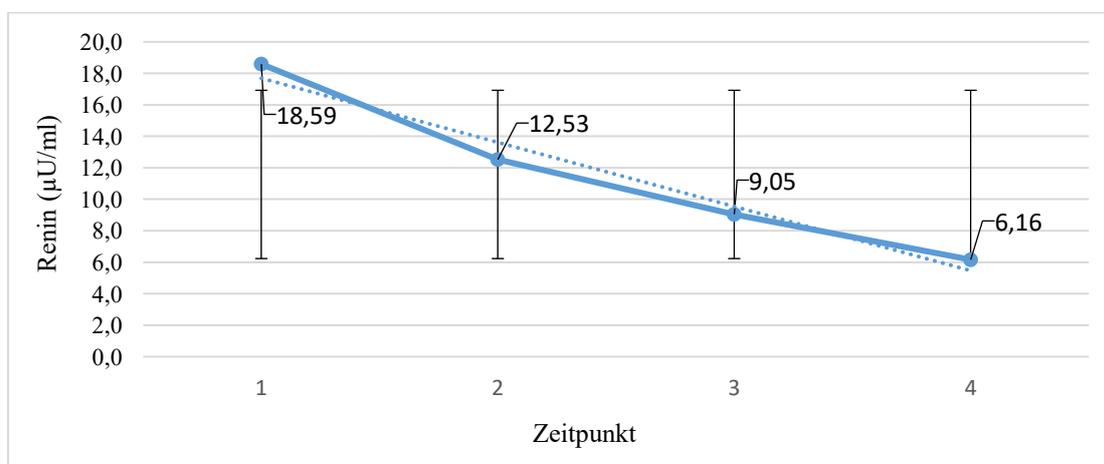


Abbildung 4. Verlauf der mittleren Reninwerte während der Kochsalzbelastung mit eingezeichneter Trendkurve und Mittelwerten.

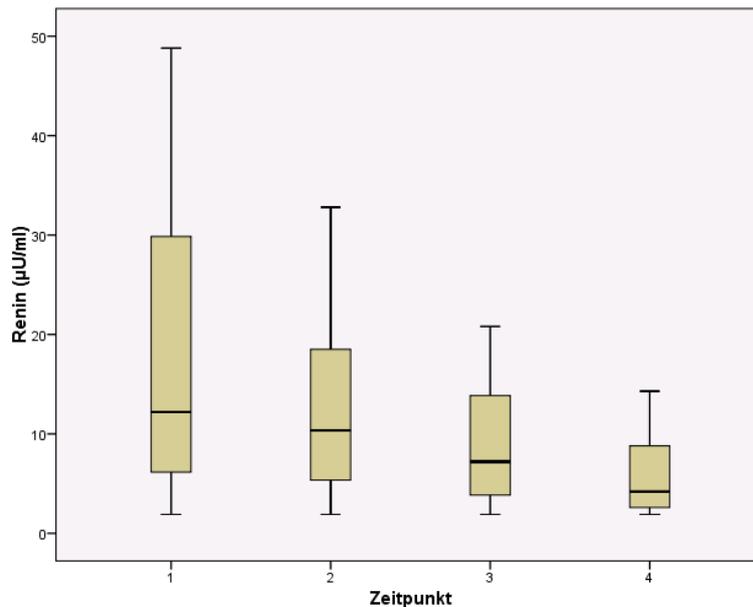


Abbildung 5. Aufstellung der mittleren Reninwerte als Boxplot zu den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten.

Tabelle 3. Renin ($\mu\text{U/ml}$) während des Kochsalzbelastungstests

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Zeitpunkt 1	20	1,9	48,8	18,59	14,410
Zeitpunkt 2	20	1,9	32,8	12,53	8,740
Zeitpunkt 3	20	1,9	20,8	9,05	6,032
Zeitpunkt 4	20	1,9	14,3	6,16	4,377

Die oben dargestellten Graphiken erläutern anschaulich den Verlauf des Renins während des Kochsalzbelastungstests als Trendkurve und als Boxplot, sowie tabellarisch.

Sowohl Renin als auch Aldosteron zeigen ähnlich dem FGF23 ein deutliches Konzentrationsgefälle auf. Besonders fällt dies im direkten Vergleich der Mittelwerte zwischen den Zeitpunkten 1 und 4 auf. Renin fällt hier von 18,59 $\mu\text{U/ml}$ auf 6,16 $\mu\text{U/ml}$ also um ca. 66%. Ähnlich verhält sich Aldosteron mit einem Konzentrationsunterschied von ca. 63% von 141,91 pg/ml auf 53,22 pg/ml .

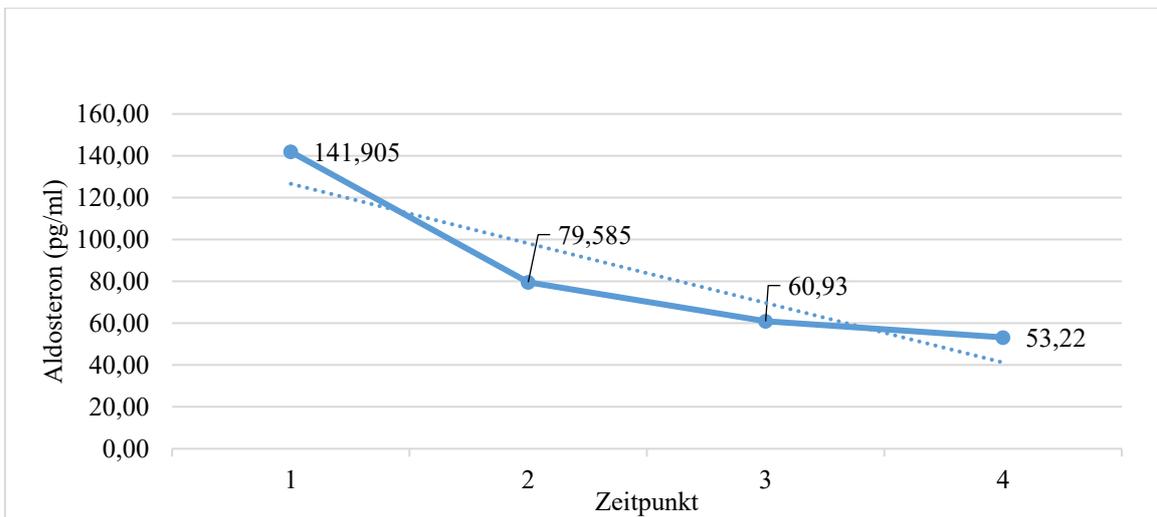


Abbildung 6. Kurvenverlauf der mittleren Aldosteronwerte mit Trendkurve und Angabe der Mittelwerte zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten.

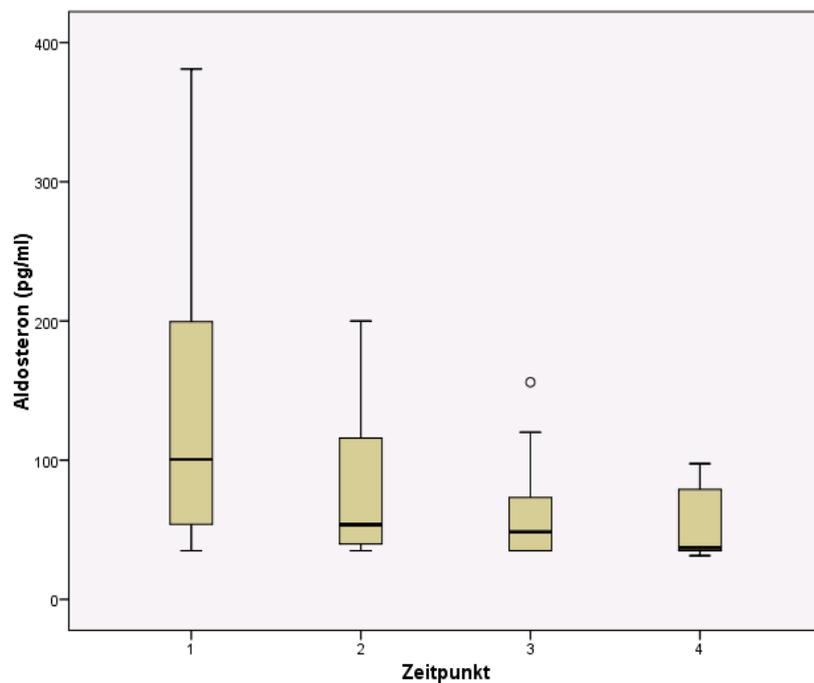


Abbildung 7. Aufstellung der Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Kochsalzbelastungstests als Boxplot.

Tabelle 4. Aldosteron (pg/ml) während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	34,90	381,00	141,91	25,337	113,309	12838,95
Zeitpunkt 2	20	34,90	200,00	79,59	11,490	51,385	2640,46
Zeitpunkt 3	20	34,90	156,00	60,93	7,834	35,034	1227,36
Zeitpunkt 4	20	31,40	97,50	53,22	5,346	23,909	571,62

Tabelle 4. gibt eine Übersicht über die mittleren Aldosteronwerte zu den vier Abnahmezeitpunkten mit jeweiligem Minimum, Maximum sowie Standardabweichung, Varianz und Standardfehlerangabe.

Durch die Infusion von 0,9% Kochsalzlösung (dies entspricht einer Na-Konzentration von 150 mmol/L Natrium) wurden neben dem Volumen auch die dazugehörigen Salze infundiert. Während des Versuches wurden die Natriumkonzentrationen der Probanden in den physiologischen Grenzen gehalten, zeigten aber dennoch einen signifikanten Konzentrationsanstieg ($p=0,019$) von 138,7 mmol/l auf 139,7 mmol/l im Mittel (vgl. Abbildung 11). Es zeigt sich also eine Erhöhung der Serum-Natrium-Konzentration. (vgl. Tabelle 6.)

Die Abbildungen 8. bis 10. veranschaulichen den Abfall des FGF23-Spiegels während der Kochsalzbelastung. Der singuläre Ausreißer beschreibt die Probandin mit den deutlich erhöhten FGF23 Werten. Bezüglich der Mediane zeigt dieser Ausreißer allerdings kaum rechnerische Bedeutung (vgl. Boxplot Abbildung 8), insbesondere, da der Trend der FGF23-Konzentrationsabnahme auch hier deutlich zu beobachten war.

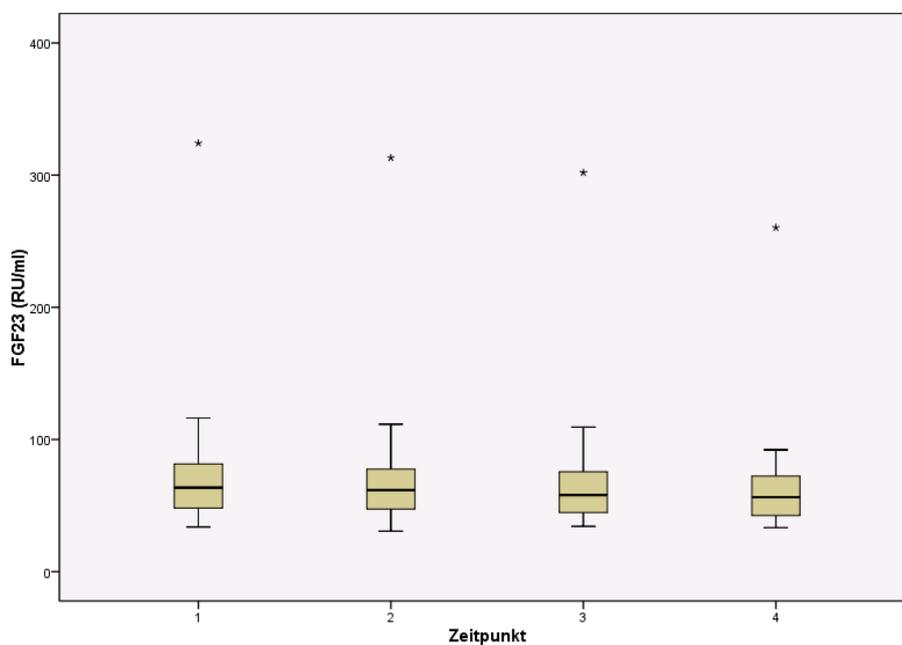


Abbildung 8. Übersicht über den FGF23 Verlauf im Boxplot zu den einzelnen Zeitpunkten.

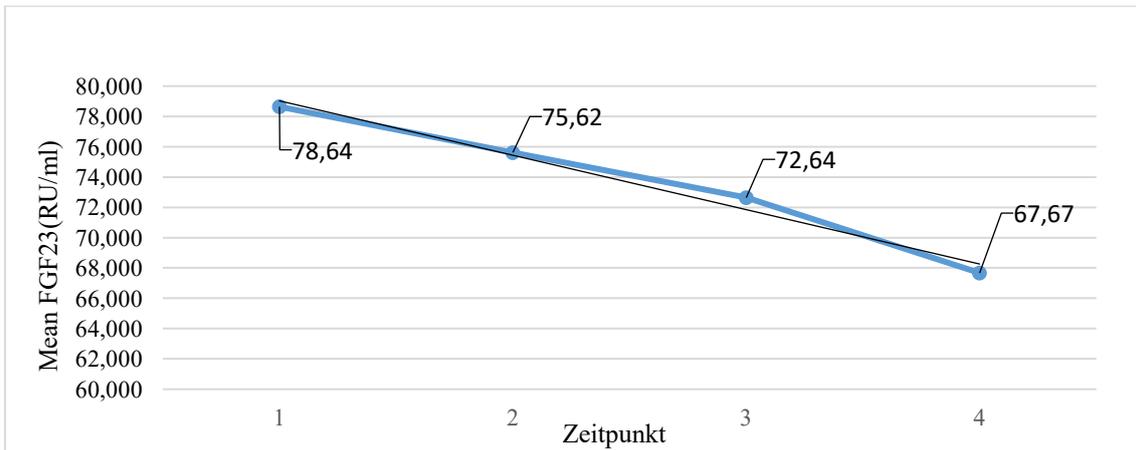


Abbildung 9. Abfall des FGF23 während der Kochsalzbelastung

Tabelle 5. FGF23 während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	33,81	324,22	78,64	13,867	62,013	3845,63
Zeitpunkt 2	20	30,67	313,15	75,62	13,364	59,766	3571,98
Zeitpunkt 3	20	34,23	301,93	72,64	12,825	57,357	3289,85
Zeitpunkt 4	20	33,24	260,35	67,67	10,791	48,257	2328,77

Oben gezeigte Tabelle gibt eine Übersicht der Veränderung der FGF23 Werte gemittelt über alle Versuchsteilnehmer im Verlauf des Kochsalzbelastungstests. Die mittlere FGF23 Konzentration zeigt sich deutlich fallend, um 13,94% ($p=0,005$).

Abbildung 10. zeigt den Kurvenverlauf für FGF 23 im Vergleich mit dem Verlauf der Gesamtproteinkonzentration. Beide bewegen sich relativ gleichsinnig, sodass man anfangs sicher von einem generellen Effekt z.B. der Verdünnung ausgehen könnte; dennoch zeigt FGF23 besonders im letzten Drittel eine etwas stärker fallende Tendenz.

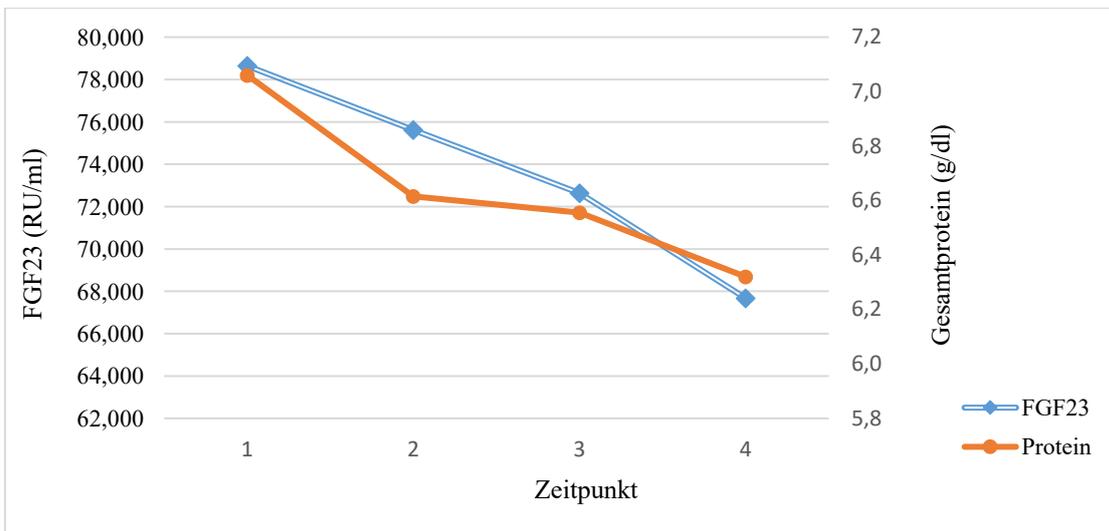


Abbildung 10. Vergleich des gemittelten FGF23 Verlaufs während des Kochsalzbelastungstests im Vergleich zum Verlauf des gemittelten Gesamtproteins.

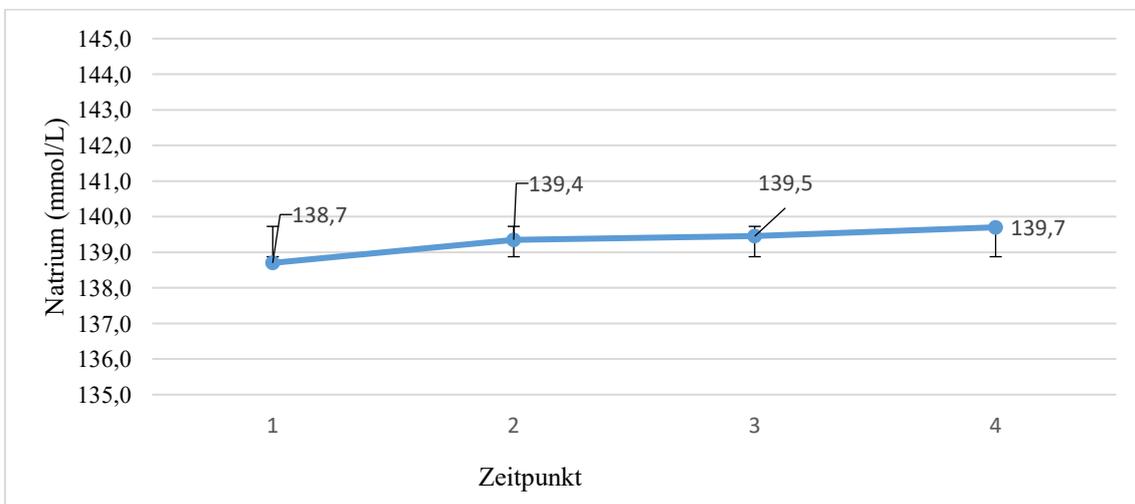


Abbildung 11. Verlauf der mittleren Natriumkonzentration während des Kochsalzbelastungstests.

Tabelle 6. Natrium während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	133	142	138,70	,47	2,080	4,33
Zeitpunkt 2	20	136	144	139,35	,39	1,755	3,08
Zeitpunkt 3	20	137	143	139,45	,34	1,538	2,37
Zeitpunkt 4	20	137	142	139,70	,30	1,342	1,80

Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die mittleren Natriumwerte zu den vier Abnahmezeitpunkten mit jeweiligem Minimum, Maximum sowie Standardabweichung, Varianz und Standardfehlerangabe. Hier zeigt sich die Konzentration im Versuchsverlauf veränderlich. Sie nimmt innerhalb der ersten zwei Stunden zu (von 138,70 auf 139,35 mmol/L) und steigt dann deutlich langsamer an (über 139,45 auf 139,7mmol/L). Auch die GFR zeigt sich unter der Kochsalzinfusion deutlich ansteigend (von 93,13 auf 102,91 ml/min/1.73m²; $p < 0,001$). In der Abbildungen 12. sowie der dazugehörigen Tabelle 7. kann man die Veränderung der mittleren GFR genauer betrachten. Ebenfalls zu beobachten ist eine signifikante ($p=0,005$) Erhöhung der Natrium Ausscheidung (von 87,9 auf 129,9 mmol/l).

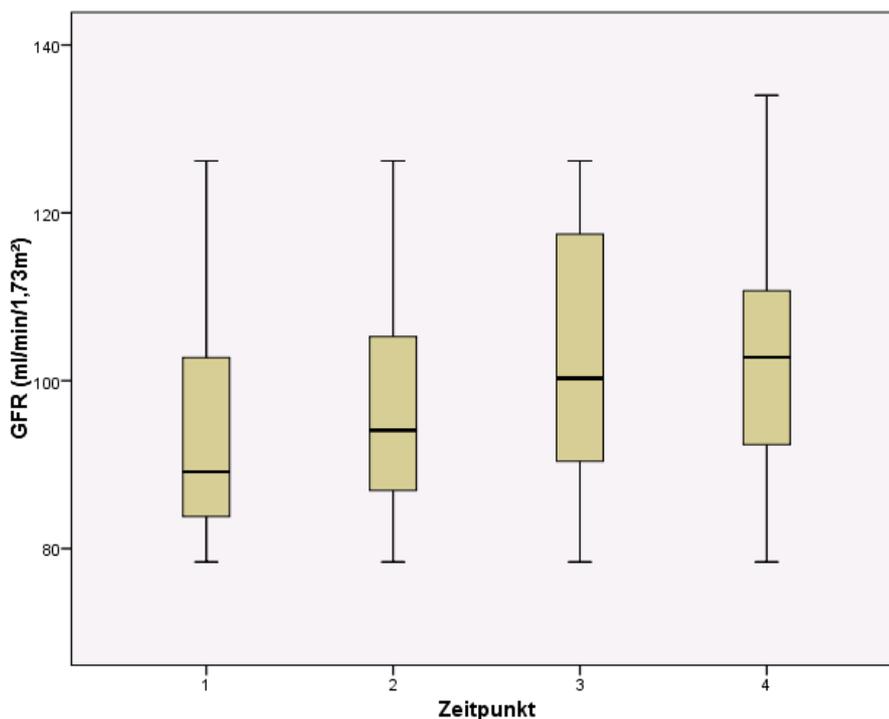


Abbildung 12. GFR zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten als Boxplot.

Tabelle 7. GFR während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	78,41	126,20	93,64	3,347	14,969	224,079
Zeitpunkt 2	20	78,41	126,20	98,24	3,272	14,633	214,135
Zeitpunkt 3	20	78,41	126,20	101,91	3,200	14,310	204,784
Zeitpunkt 4	20	78,41	134,00	102,91	3,296	14,741	217,307

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die mittleren GFR zu den vier Abnahmezeitpunkten mit jeweiligem Minimum, Maximum sowie Standardabweichung, Varianz und Standardfehlerangabe.

Hierbei fällt auf, dass die Extremata sich unverändert zeigen, wobei die mittlere GFR über alle Versuchsteilnehmer eine ansteigende Tendenz zeigt.

Da die Studie auch Bezug zu den Parametern der menschlichen Blutdruckregulation nehmen soll, wurde in den Versuchen auch die ANP und die CTpro-AVP (Copeptin) bestimmt. Wie zu erwarten stieg unter Volumenbelastung auch die Konzentration von ANP (von 46,97 auf 52,39 pmol/L; $p=0,23$, nicht signifikant) während das Copeptin (von 4,92 auf 3,63 pmol/L; $p=0,0003$, hoch signifikant) abfiel.

Deutlich wird dies auch in den beiden unten angeführten Abbildungen 13. und 14. sowie den dazugehörigen Tabellen 8. und 9. Die Messungen der beiden Hormone wurden aus Praktikizitätsgründen auf die Zeitpunkte 1 und 4 beschränkt. Aufgrund eines Laborfehlers konnte bei fehlendem Wert das Copeptin nur für 19 Personen evaluiert werden. Bei der zu erwartenden physiologischen Steigerung des ANP bei den ersten 10 Versuchspersonen wurde aufgrund fehlender Relevanz für die weiteren Untersuchungen auf die Fortsetzung der Parameterbestimmung verzichtet.

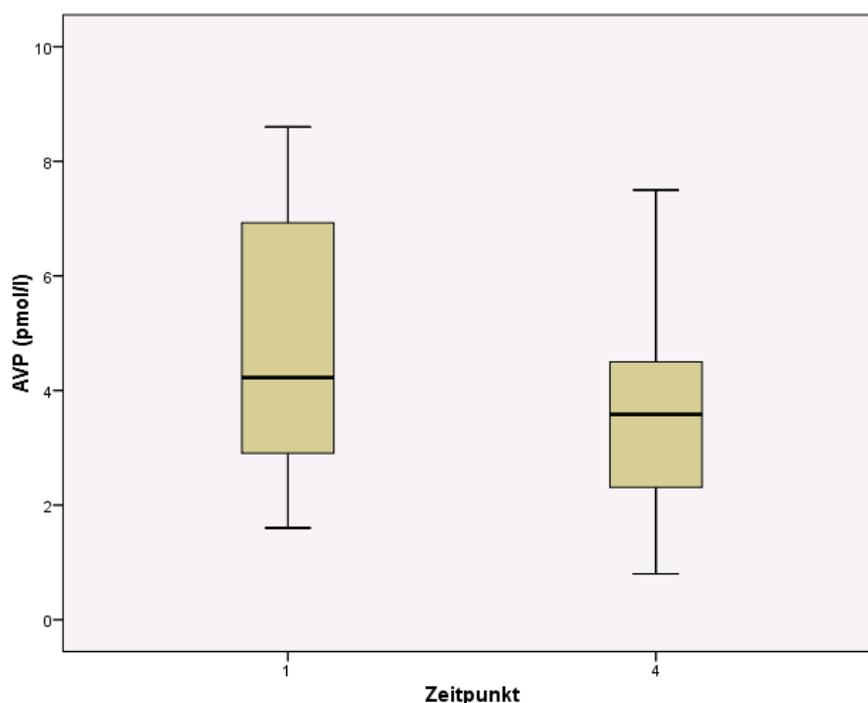


Abbildung 13. Boxplotgrafik der Messungen des Copeptin AVP (entspricht ADH) zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest

Tabelle 8. AVP (pmol/L) während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	19	1,60	8,60	4,92	,534	2,33	5,43
Zeitpunkt4	19	,80	7,50	3,63	,392	1,71	2,93

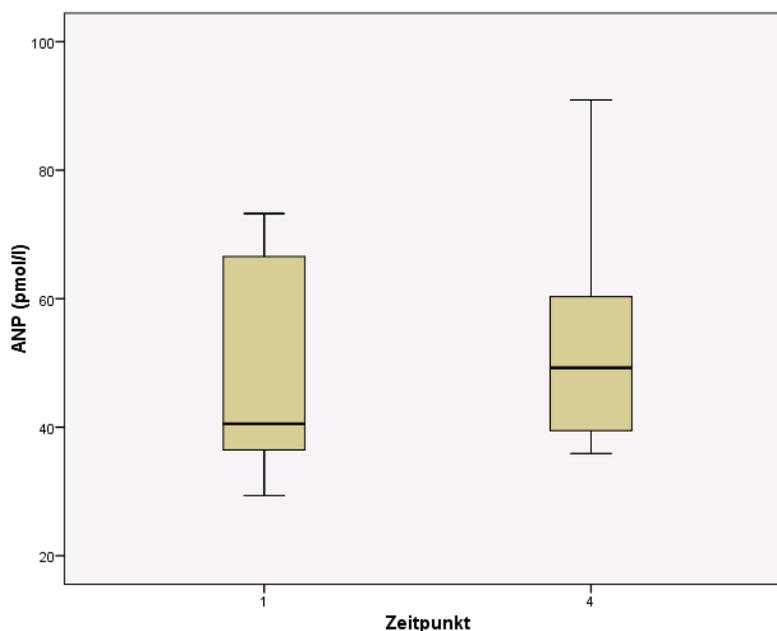


Abbildung 14. Boxplotgrafik der Messungen des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest.

Tabelle 9. ANP (pmol/L) während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	10	29,36	73,24	46,97	5,144	16,267	264,61
Zeitpunkt 4	10	35,90	90,92	52,39	5,158	16,311	266,05

Ein weiterer Parameter, der untersucht wurde, war das PTH. Wie eingangs erwähnt gibt es bisher viele Hinweise auf eine direkte oder indirekte Verknüpfung der Hormone FGF23 und PTH.

Interessanterweise zeigt sich das PTH im Infusionsversuch, sprich in einer akuten Situation der Volumen- und Kochsalzzufuhr signifikant ($p=0,019$) von 35,33 auf 49,68 pg/ml ansteigend (vgl. Abbildung 15 und die Tabelle 10.)

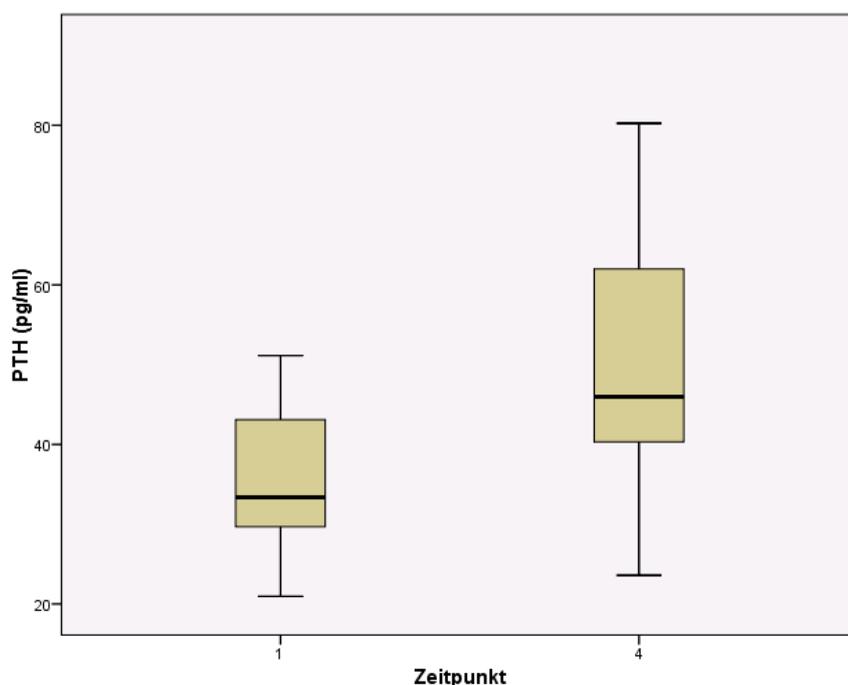


Abbildung 15. Boxplotgrafik der Messungen des PTH zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest.

Tabelle 10. PTH (pg/ml) während des Kochsalzbelastungstests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	19	20,95	51,14	35,3337	2,010	8,762	76,76
Zeitpunkt 4	19	23,59	80,24	49,6753	3,893	16,967	287,89

Eine zentrale Forschungsaufgabe war es, mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen, oben besprochenen Parametern zu entdecken.

Hierzu wurde eine Pearsonsche Korrelation zwischen FGF23 und ausgewählten Parametern errechnet.

In Tabelle 11. sind die Pearson-Korrelationen, zusammen mit den dazugehörigen Signifikanzniveaus, zwischen FGF23 und verschiedenen anderen Parametern während der Kochsalzbelastung aufgeführt. Hier zeigt sich eine signifikante ($p < 0,001$) deutlich negative Korrelation zwischen FGF23 und der GFR. Bezüglich der weiteren dargestellten Parameter ließ sich keine signifikante Korrelation berechnen.

Tabelle 11. Korrelation zwischen FGF23 und den angeführten Parametern im Kochsalzbelastungstest

Pearson	Renin	Aldosteron	Na	GFR	iPTH	Gesamt-protein	CT-pro AVP	Ca
FGF23	$r = -0,07$ $p = 0,526$	$r = -0,036$ $p = 0,751$	$r = -0,009$ $p = 0,936$	$r = -0,46$ $p < 0,001$	$r = -0,24$ $p = 0,145$	$r = 0,158$ $p = 0,161$	$r = -0,071$ $p < 0,673$	$r = 0,143$ $p = 0,205$

5.3. Der Furosemidtest

In diesem Test wurde versucht den Natriumhaushalt durch intravenöse Applikation von Furosemid zu verändern.

Abbildungen 16. und 17. geben mit der Tabelle 12. einen Überblick über alle FGF23 Verläufe während dieses Experiments.

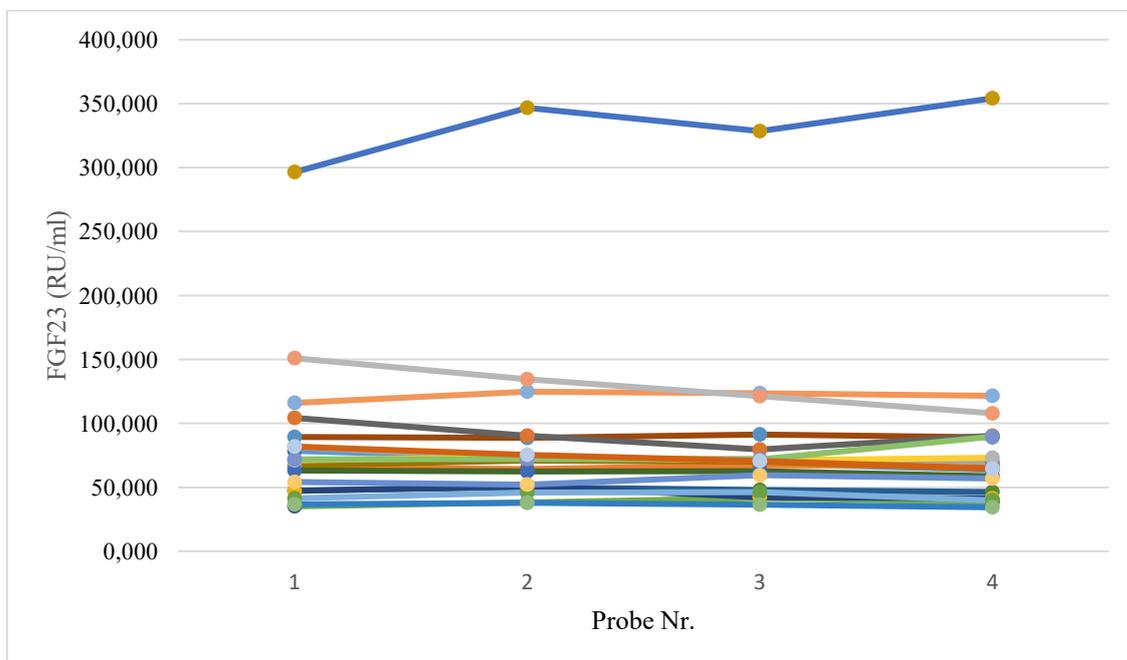


Abbildung 16. Übersicht der einzelnen Verläufe der FGF23 Konzentration während des Furosemidtests

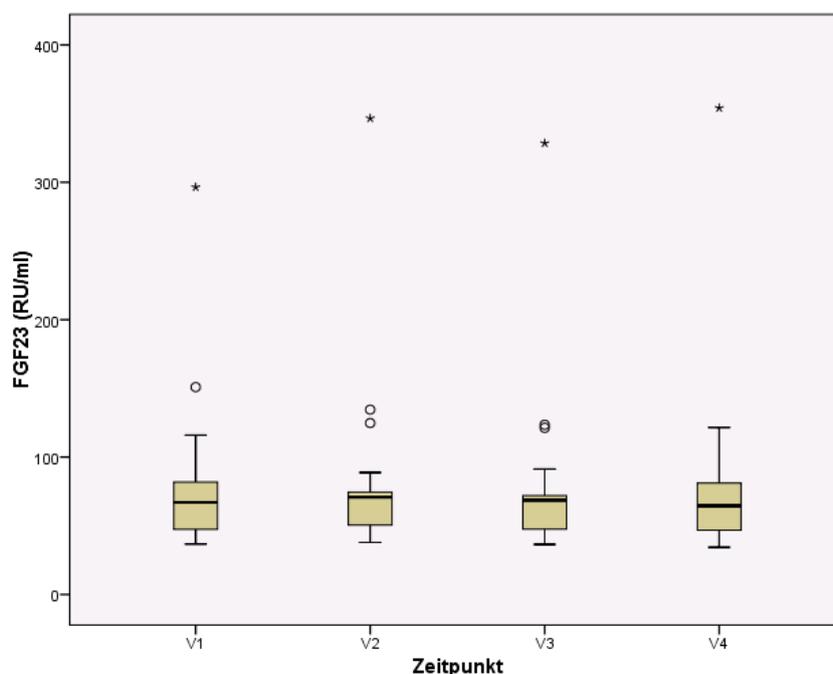


Abbildung 17. Übersicht über den FGF23 Verlauf im Boxplot zu den einzelnen Zeitpunkten.

Wie in Abbildung 17. ersichtlich ist, wies die oben erwähnte Versuchsteilnehmerin deutlich erhöhte Basis FGF23 Werte auf. Die generelle Tendenz der Wertveränderung zeigt sich jedoch gleich zu den Probanden mit niedrigeren Ausgangswerten.

Tabelle 12. FGF 23 (RU/ml) während des Furosemidtests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	35,07	296,41	79,22	13,056	58,387	3409,07
Zeitpunkt 2	20	37,86	346,55	81,43	15,067	67,381	4540,21
Zeitpunkt 3	19	36,45	328,45	81,03	14,799	64,506	4160,98
Zeitpunkt 4	20	34,34	354,14	78,78	15,393	68,840	4738,88

Tabelle 12. gibt eine Übersicht über die mittleren FGF23 zu den vier Abnahmezeitpunkten mit jeweiligem Minimum, Maximum sowie Standardabweichung, Standardfehler und Varianz. Hier zeigt sich anfänglich eine leichte Konzentrationssteigerung in der ersten Stunde von 79,22 auf 81,43 RU/ml; $p=0,44$, nicht signifikant) die über die nachfolgende Stunde beibehalten wird (81,03 RU/ml). Hiernach zeigt sich die Konzentration wieder sinkend, Interessanterweise auf einen Mittelwert, der unter dem Ausgangswert liegt (78,87 RU/ml zum Zeitpunkt 4 im Vergleich zu 78,78 zum Zeitpunkt 1).

Die Abbildung 18. zeigt den Verlauf der gemittelten FGF23-Konzentration im Vergleich mit dem Verlauf für das Gesamtprotein. Hier zeigt sich grafisch der oben beschriebene FGF23-Peak nach einer Stunde und ein gradueller Abfall bis unterhalb des Ausgangswertes nach vier Stunden. Gerade im letzten Drittel zeigt sich im Vergleich mit dem Gesamtprotein ein erheblicher Unterschied. Während beide Kurven am Anfang ansteigen, was durchaus auch durch eine Volumenreduktion und folglich Konzentration im Serum erklärbar wäre, zeigt sich das Gesamtprotein stabil bei einer Konzentrationssteigerung von fast 8% gegenüber dem Ausgangswert (von 7,09 zum Zeitpunkt 1 auf 7,55 g/dl zum Zeitpunkt 4), während die FGF23-Konzentration wieder deutlich sinkt 81,02 RU/ml zum Zeitpunkt 3 auf 78,77 RU/ml zum Zeitpunkt 4).

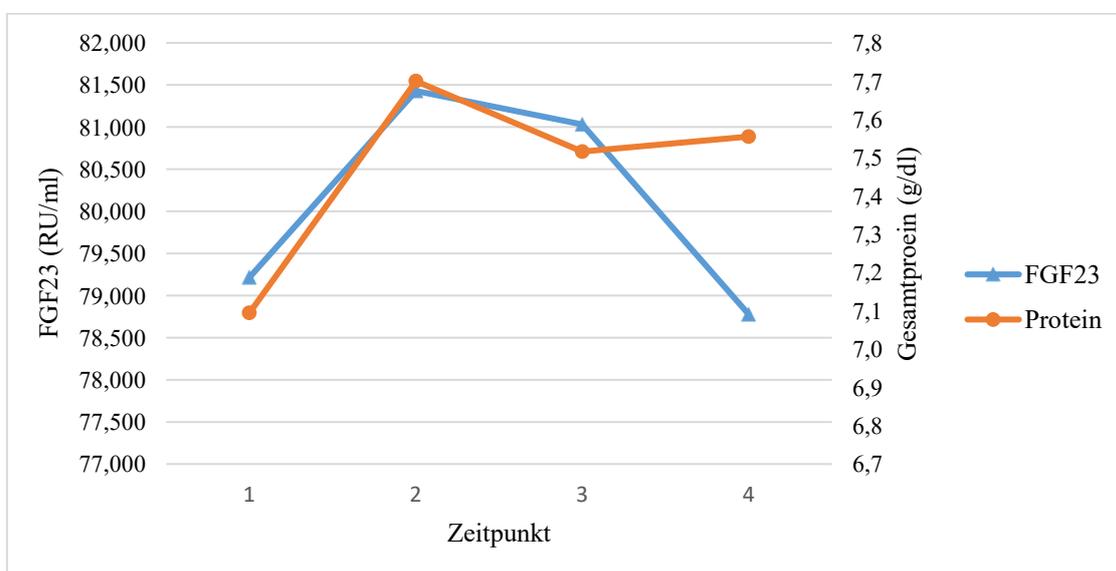


Abbildung 18. Vergleich der Verläufe des mittleren FGF23 mit der mittleren Proteinkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests.

Die Abbildungen 19. und 20. und die Tabelle 13. geben den Verlauf des Kreatinins im Furosemidtest an. Hier zeigt sich eine nahezu stabile mittlere Kreatininkonzentration über alle 4 Abnahmezeitpunkte.

Tabelle 13. Kreatinin während des Furosemidtests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	,7	1,3	,98	,0337	,151	,02
Zeitpunkt 2	20	,7	1,3	1,00	,0308	,137	,02
Zeitpunkt 3	19	,7	1,2	,97	,0304	,133	,02
Zeitpunkt 4	20	,7	1,2	,99	,0293	,131	,02

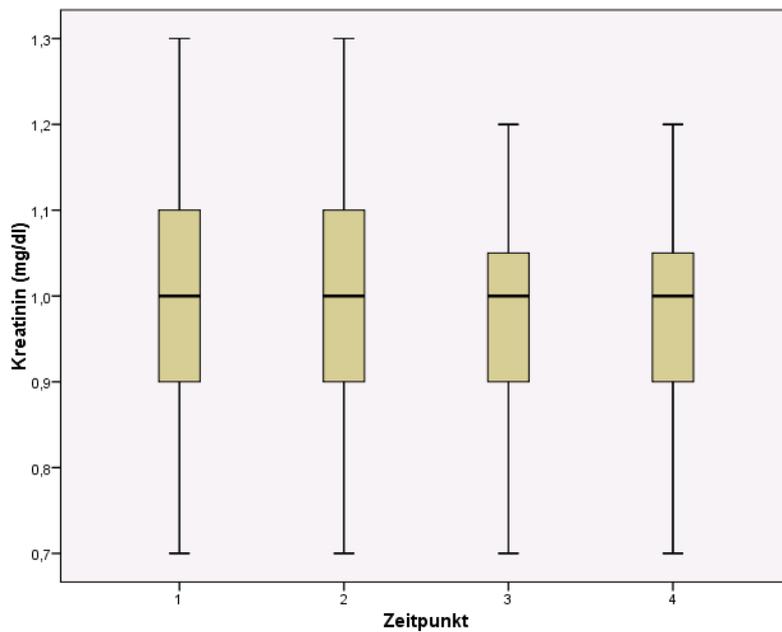


Abbildung 19. Boxplot der Kreatininkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten im Furosemidtest.

In den Abbildungen 20. und 21. sowie in der dazugehörigen Tabelle 14. werden die Verläufe von Renin in diesem Versuchsaufbau dargestellt: Der Reninspiegel wurde wie erwartet bei gesunden Probanden, die sich einem Furosemidtest unterziehen, um 97% von 14,2 ($\mu\text{U}/\text{ml}$) auf 26,3 ($\mu\text{U}/\text{ml}$) nach vier Stunden mit einem Maximum vom 28,04 ; $p=0,017$) nach einer Stunde angehoben.

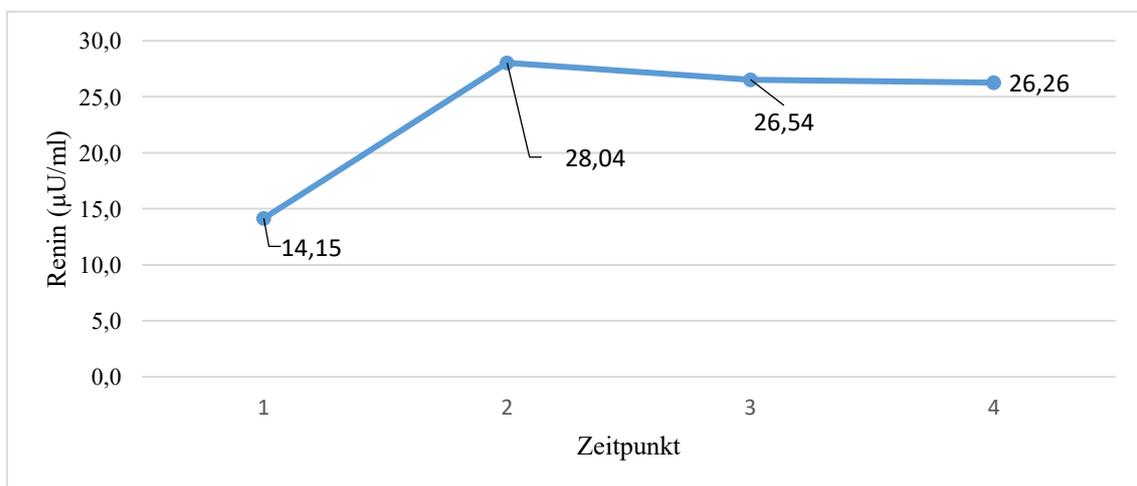


Abbildung 20. Verlauf der Reninwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests.

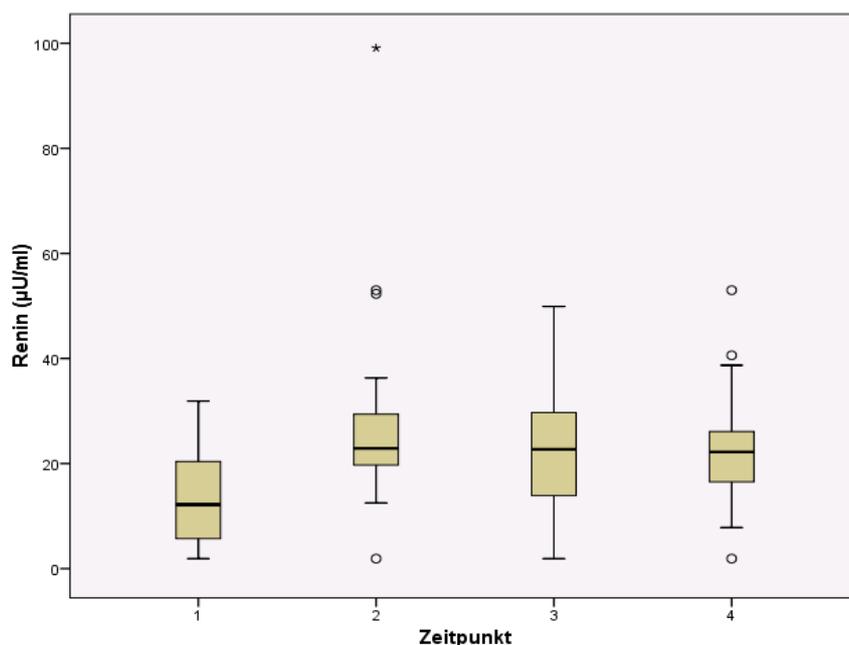


Abbildung 21. Aufstellung der Reninwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests als Boxplot.

Tabelle 14. Das Mittlere Renin ($\mu\text{U/ml}$) im Versuchsverlauf des Furosemidtests zu den vier Abnahmezeitpunkten

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	18	1,90	31,90	14,15	9,138	83,51
Zeitpunkt 2	20	1,90	99,10	28,04	20,797	432,51
Zeitpunkt 3	19	1,90	91,30	26,54	20,040	401,62
Zeitpunkt 4	19	1,90	89,60	26,26	19,445	378,10

In Tabelle 14 sind die Werte des Furosemidtests zu den vier Abnahmezeitpunkten mit jeweiligem Minimum, Maximum sowie Standardabweichung, Varianz und Standardfehlerangabe dargestellt. Das Renin zeigt eine deutliche Reaktion auf die Furosemidinfusion in der ersten Stunde, was sich in einem deutlichen Konzentrationssteigerung von 14,15 auf 28,04 $\mu\text{U/ml}$, also fast einer Verdoppelung widerspiegelt-

Aldosteron reagiert entgegengesetzt zum Kreatinin mit einem Konzentrationsabfall um 26,5 % nach zwei Stunden von 134,04 auf 98,57 pg/ml) und einem Wiederanstieg (auf 112,08 pg/ml) in den Stunden danach, wie in den Abbildungen 22. und 23. und in der Tabelle 15 aufgezeigt wird.

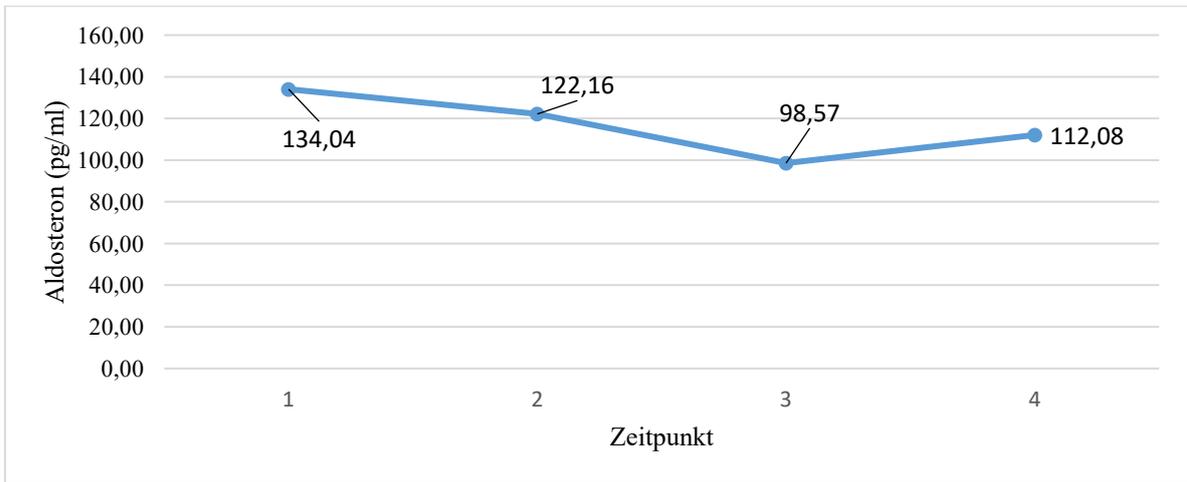


Abbildung 22. Verlauf der mittleren Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests.

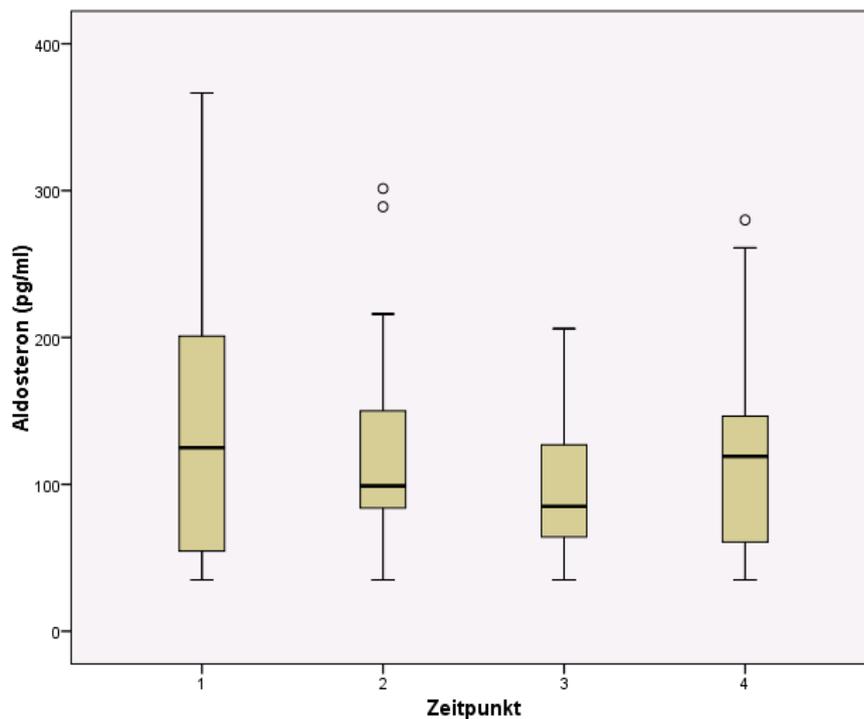


Abbildung 23. Aufstellung der Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests als Boxplot.

Tabelle 15. Das Mittlere Aldosteron (pg/ml) im Versuchsverlauf des Furosemidtests.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	18	34,90	366,50	134,04	23,093	97,974	9598,85
Zeitpunkt 2	20	34,90	301,40	122,16	16,924	75,687	5728,58
Zeitpunkt 3	19	34,90	206,00	98,57	11,486	50,066	2506,64
Zeitpunkt 4	19	34,90	280,00	112,08	17,332	75,548	5707,44

In der Abbildung 24. in der Tabelle 16. wird der Verlauf der Natriumkonzentration gezeigt. Wie auch im ersten Versuch wird die Natriumkonzentration im physiologischen Bereich gehalten. Eine signifikante Änderung ist hier nicht nachweisbar.

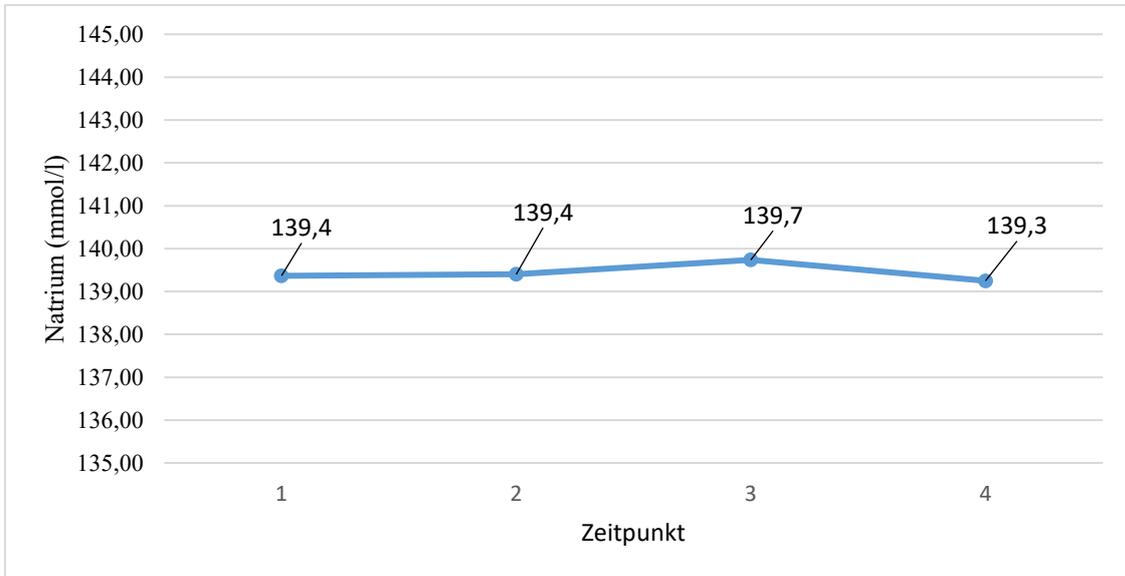


Abbildung 24. Verlauf der mittleren Natriumkonzentration während des Furosemidtests.

Tabelle 16. Mittlere Natriumkonzentration im Verlauf des Furosemidtests.

	N	Min.	Max	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	20	135	143	139,40	,432	1,930	3,726
Zeitpunkt 2	20	136	142	139,40	,328	1,465	2,147
Zeitpunkt 3	19	137	144	139,74	,418	1,821	3,316
Zeitpunkt 4	20	135	141	139,25	,323	1,446	2,092

Die GFR zeigte sich im Furosemidtest ebenfalls kaum veränderlich, was sich natürlich schon am nahezu konstanten Kreatinin erahnen lässt. Tendenziell zeigte sich eine Stunde nach Medikamentenapplikation eine GFR Verschlechterung Von 94,11 auf 91,66 ml/min/173m², die sich in der Folge wieder normalisierte (94,52 ml/min/173m² zum Zeitpunkt 3)

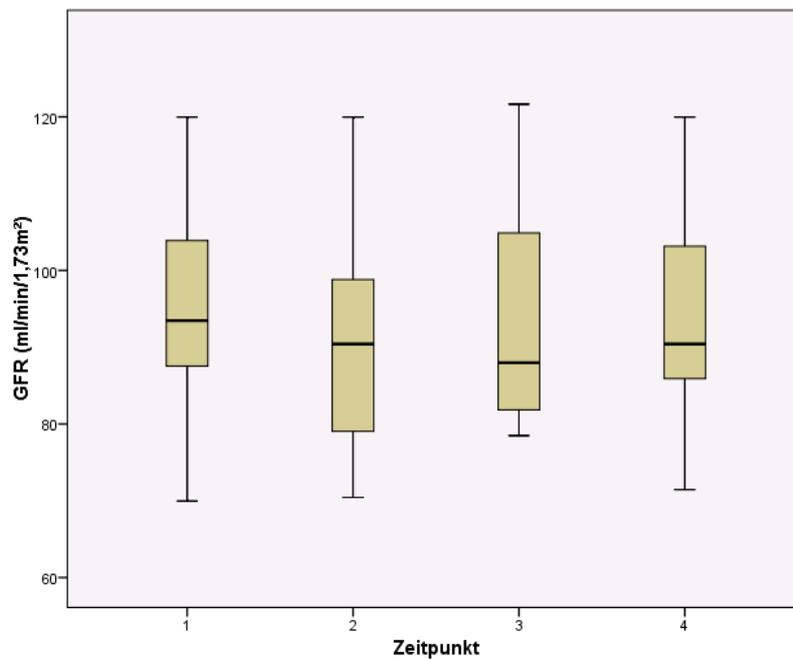


Abbildung 25. GFR während des Furosemidtests.

Tabelle 17. GFR (ml/min/173m²) während des Furosemidtests

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung
Zeitpunkt 1	20	69,95	119,96	94,11	14,116
Zeitpunkt 2	20	70,44	119,96	91,66	14,393
Zeitpunkt 3	19	78,49	121,66	94,52	15,429
Zeitpunkt 4	20	71,44	119,96	93,13	13,216

ANP zeigte im Versuchsverlauf eine deutliche Konzentrationsabsenkung, von im Mittel 68,56 auf 44,91 pmol/L; $p < 0,0001$) (vgl. Abbildung 26 und Tabelle 18.). Dahingegen zeigte sich das AVP deutlich steigend von im Mittel 4,64 auf 5,64 pmol/L; $p = 0,149$) (vgl. Abbildung 27. und Tabelle 19.)

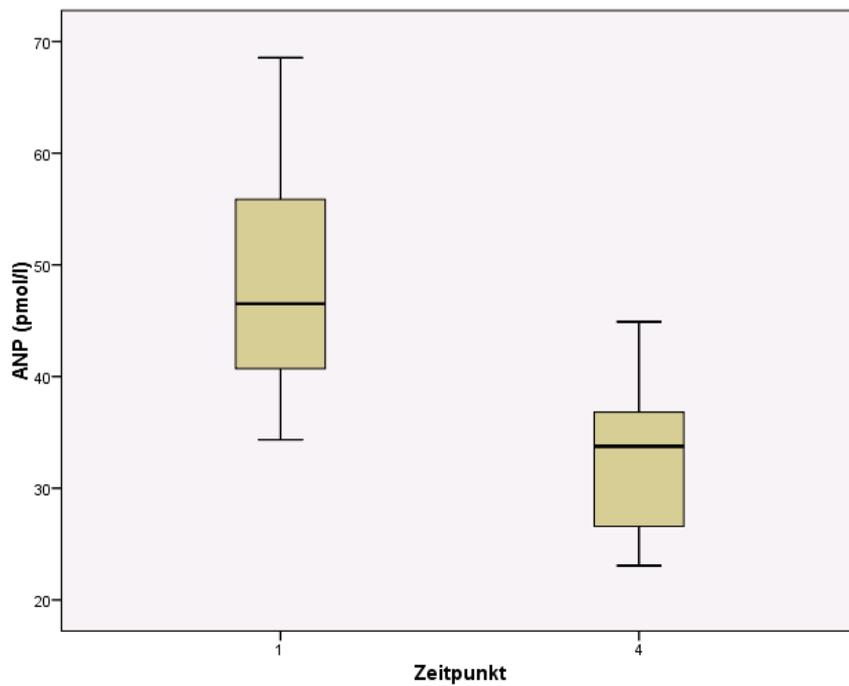


Abbildung 26. Boxplot der ANP Werte zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4 zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.

Tabelle 18. ANP (pmol/L) während des Furosemidtests

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- fehler	Standard- abweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	10	34,34	68,56	47,63	3,27908	10,369	107,523
Zeitpunkt 4	10	23,08	44,91	32,63	2,06898	6,543	42,807

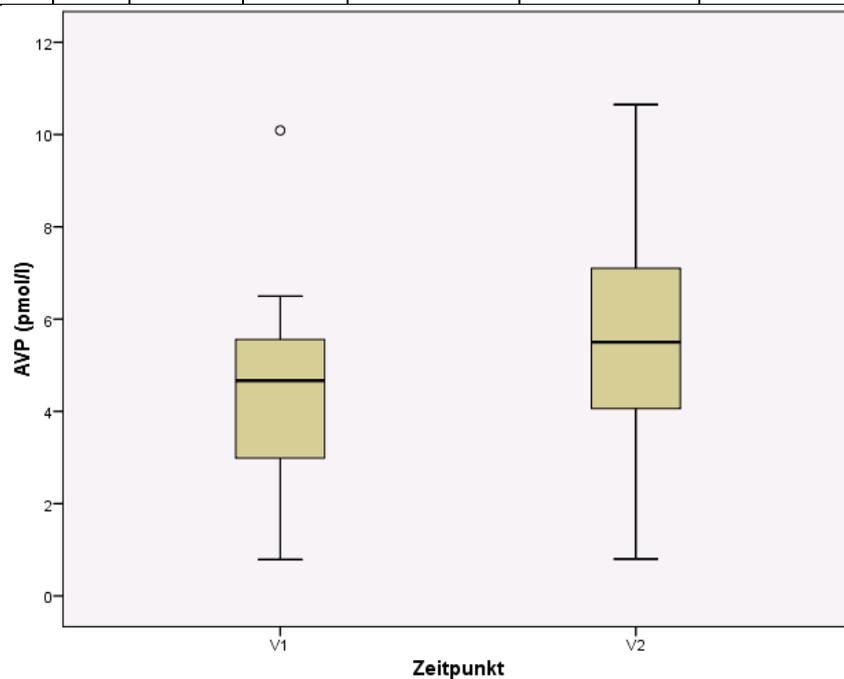


Abbildung 27. Boxplot der AVP (Copeptin) Werte zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4 zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.

Tabelle 19. AVP(Copeptin) (pmol/L) zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4 zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	19	,790	10,090	4,64253	,448341	1,954273	3,819
Zeitpunkt 2	19	,00	10,650	5,60089	,521457	2,272980	5,166

Das Parathormon zeigte sich in diesem Versuch leicht, allerdings nicht statistisch signifikant, ansteigend (von 36,79 auf 37,06 pg/ml).

Tabelle 20. PTH (pg/ml) im Furosemidtest.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	19	16,09	59,88	36,7863	2,674	11,65770	135,902
Zeitpunkt 2	19	20,37	57,42	37,0637	2,324	10,13192	102,656

Wie schon im ersten Versuch konnte beim Furosemidtest keine Korrelation zwischen FGF23 und Renin, Aldosteron oder Natrium nachgewiesen werden (Tabelle 21.) jedoch wieder eine signifikante, negative Korrelation nach Pearson zwischen FGF23 und der glomerulären Filtrationsrate ($r = -0,46$; $p < 0,001$).

Ebenfalls konnte auch eine negative Korrelation zwischen FGF23 und PTH ($r = -0,24$) wiederholt berechnet werden. Allerdings auch diesmal ohne Signifikanznachweis ($p = 0,139$).

Tabelle 21. Korrelationen nach Pearson zwischen FGF23 und den angeführten Parametern im Furosemidtest

Pearson	Renin	Aldosteron	Na	GFR	Ca	Ca	iPTH	proAVP	Gesamtprotein
FGF23	$r = -0,01$ $p = 0,928$	$r = 0,026$ $p = 0,821$	$r = 0,021$ $p = 0,852$	$r = -0,463$ $p < 0,001$	$r = 0,1$ $p = 0,361$	$r = 0,061$ $p = 0,643$	$r = -0,24$ $p = 0,139$	$r = -0,031$ $p = 0,855$	$r = -0,02$ $p = 0,859$

5.4. Der orale Wasserbelastungstest

Wie beim klinischen oralen Wasserbelastungstest zu erwarten, wurde ein Großteil der aufgenommenen Flüssigkeit schon innerhalb der ersten eineinhalb Stunden ausgeschieden. Auch die Urinosmolalität sank folglich sehr deutlich ab von 742 auf 132 mosm; $p < 0,0001$). Andere Parameter wie Phosphat (4,10 auf 3,83 mg/dl; $p = 0,015$), Kreatinin (von 0,99 auf 0,92 mg/dl; $p < 0,001$) und Harnstoff (von 30,5 auf 26,7g/dl; $p < 0,001$) ebenso. Die Ergebnisse zeigten sich allesamt signifikant.

Der Kalziumspiegel zeigte sich dazu im Gegensatz steigend von 2,36 auf 2,40 mmol/L (p=0.028)

Tabelle 22. Änderung ausgewählter Parameter im oralen Wasserbelastungstest.

Parameter	Basiswerte	Endwerte	P
Gesamtprotein mg/dl	7,4 (0,46)	7,2 (0,49)	0,037
Kalzium mmol/l	2,36 (0,11)	2,40 (0,12)	0,028
Phosphat mg/dl	4,10 (0,49)	3,83 (0,33)	0,015
Kreatinin mg/dl	0,99 (0,12)	0,92 (0,13)	<0,001
Harnstoff mg/dl	30,5 (6,39)	26,7 (5,68)	<0,001
Urin Osmolalität mosm	742 (194)	132 (38,7)	
FGF23(RU/ml)	89,1 (68,7)	78,4 (60,0)	0.016

Vor allem die FGF23-Konzentration sank ab, um ca. 12%, von 89,1 (RU/ml) auf 78,4 (RU/ml) (vgl. Abbildungen 28. bis 30. und Tabelle 23.). Im Vergleich mit dem Gesamtprotein zeigt sich ein langsamerer und stetiger Abfall des FGF23, mit einem Abwärtstrend nach vier Stunden (vgl. Abbildung 31.).

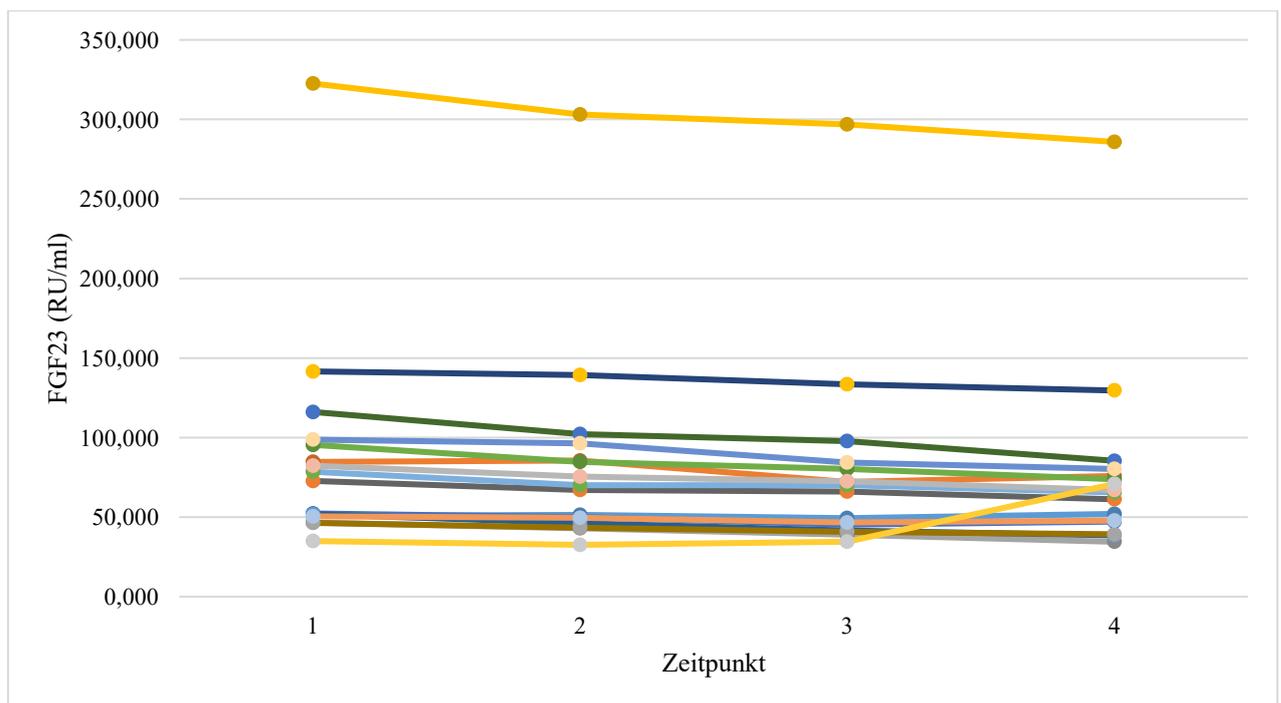


Abbildung 28. Einzelverläufe des FGF23 während des oralen Wasserbelastungstests.

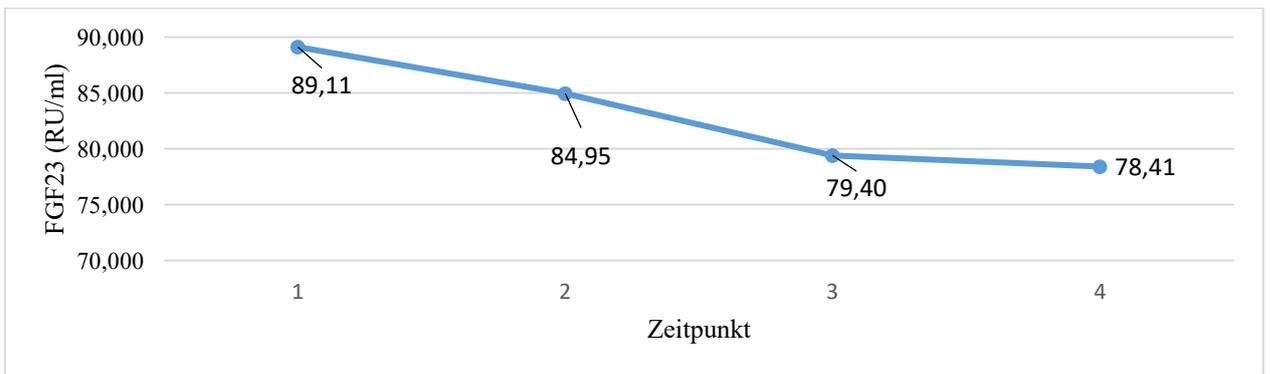


Abbildung 29. Verlauf der mittleren FGF23 Werte während des oralen Wasserbelastungstests.

Die Abbildungen 28. Und 29. zeigen die individuellen respektive die mittleren FGF23 Verläufe während dieses Versuchsaufbaus. Wiederum ist hier die Versuchsperson mit den deutlich erhöhten FGF23 als Ausreißer sichtbar. Wiederum zeigt sich hier allerdings der Trend des Gesamtverlaufs zu den anderen Probanden kongruent. Dieser Versuch konnte aufgrund fehlender Messdaten nur für 16 Versuchspersonen entsprechend korrekt berechnet werden.

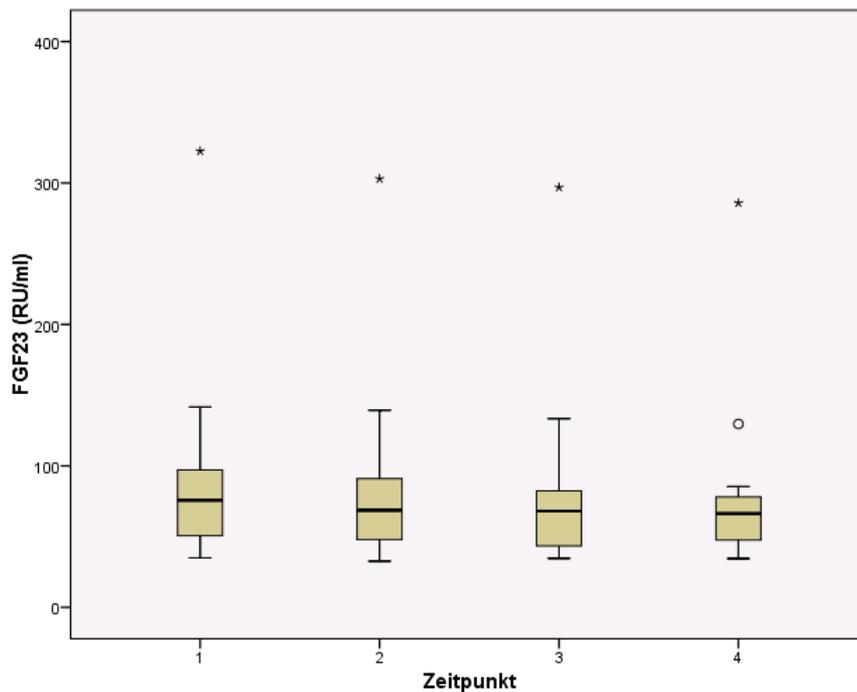


Abbildung 30. Boxplot des FGF23 während des oralen Wasserbelastungstests zu den vier Abnahmezeitpunkten.

Tabelle 23. Übersicht über FGF23 (RU/ml) während des oralen Wasserbelastungstests.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	34,93	322,56	89,11	17,180	68,720	4722,478
Zeitpunkt 2	16	32,55	302,99	83,73	16,186	64,743	4191,713
Zeitpunkt 3	16	34,62	296,95	79,40	15,902	63,606	4045,771
Zeitpunkt 4	16	34,47	285,88	78,41	15,007	60,030	3603,559

Abbildung 31. zeigt den Vergleich der mittleren FGF23 Verläufe mit den mittleren Proteinkonzentrationen während der vier Abnahmezeitpunkte. Die Proteinkurve zeigt einen deutlichen Knick, nach der ersten Stunde von 7,42 g/dl auf 7,03 g/dl mit folgendem Konzentrationsanstieg bis maximal 7,24 g/dl nach vier Stunden, ganz ähnlich zum Kurvenverlauf von Renin und Natrium (vgl. Abbildungen 34 bis 36), während die FGF23 Konzentration über die gesamten vier Stunden sinkt (von 89,11 RU/ml auf 78,4 RU/ml).

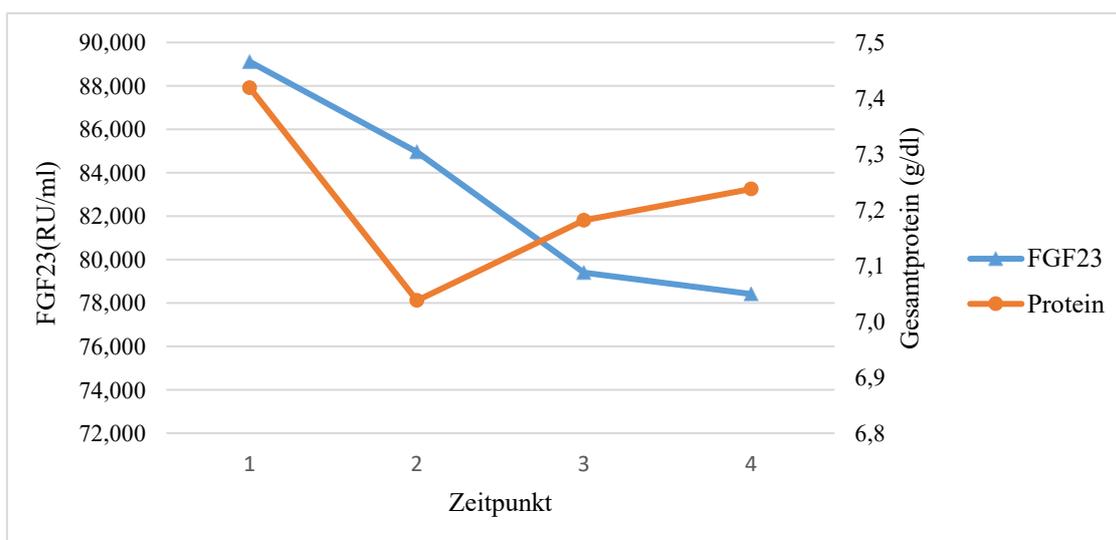


Abbildung 31. Vergleich der Kurvenverläufe anhand der Mittelwerte zwischen FGF23 und dem Gesamtprotein während des oralen Wasserbelastungstests.

Generell wurde das überflüssige Volumen innerhalb einer Stunde zum größten Teil wieder ausgeschieden. Der harntreibende Effekt war dabei sogar größer als nach Furosemidinfusion und deutlich größer im Vergleich zur intravenösen Kochsalzbelastung. Die mittlere Sammelmenge betrug 1310 ml (min. 400 ml, max. 2000 ml). Der größte Anteil an der Ausscheidungsmenge konnte innerhalb der ersten zwei Stunden beobachtet werden.

Während das Gesamtprotein einen relativ schnellen und steilen Abfall zeigt, entwickelt FGF23 einen langsameren, flacheren aber beständigen negativen Kurvenverlauf. Auch zu dem Zeitpunkt, an dem die mittlere Gesamtproteinkonzentration einen Wiederanstieg zeigt, verhält sich das FGF23 weiterhin absinkend.

Der Aldosteronspiegel weist eine Absenkung innerhalb der vier Stunden um 37,9% von 190,21 (pg/ml) auf 118,08 (pg/ml) auf. Die maximale Absenkung wurde nach zwei Stunden erreicht; hier um sogar 46% auf 102,41 (pg/ml) im Vergleich zum Ausgangswert. (vgl. Abbildungen 32., 33. und Tabelle 24.).

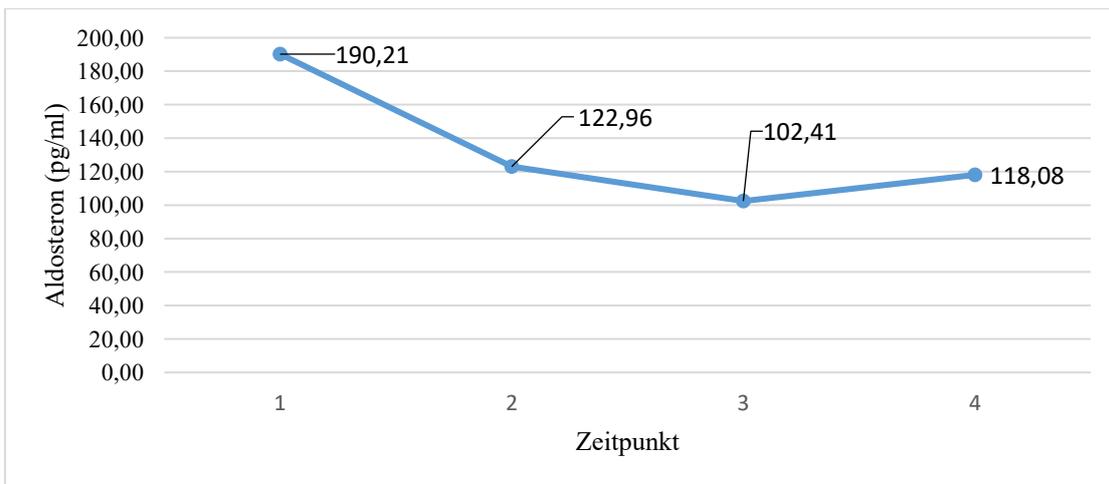


Abbildung 32. Verlauf des mittleren Aldosterons während der oralen Wasserbelastung.

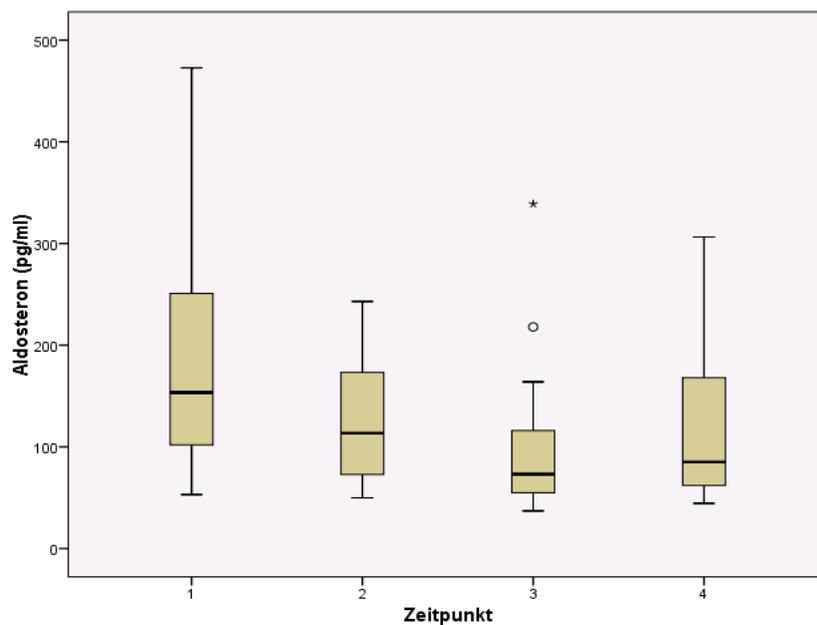


Abbildung 33. Boxplot der Aldosteronkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.

Tabelle 24. Aldosteron (pg/ml) während der oralen Wasserbelastung

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	53,10	472,80	190,21	28,925	115,700	13386,52
Zeitpunkt 2	16	49,90	243,00	122,96	14,565	58,261	3394,33
Zeitpunkt 3	16	37,00	339,00	102,41	19,896	79,586	6333,85
Zeitpunkt 4	16	44,50	306,40	118,08	18,740	74,961	5619,20

Die Abbildungen 34. und 35. geben zusammen mit der Tabelle 25. eine Übersicht über den Verlauf von Renin. Hier zeigt sich ein deutlicher Konzentrationsabfall um 32% innerhalb der ersten Stunde (von 24,78 auf 16,73 $\mu\text{U/ml}$; $p=0,006$) mit langsamen Wiederanstieg auf maximal 21,16 $\mu\text{U/ml}$ nach vier Stunden.

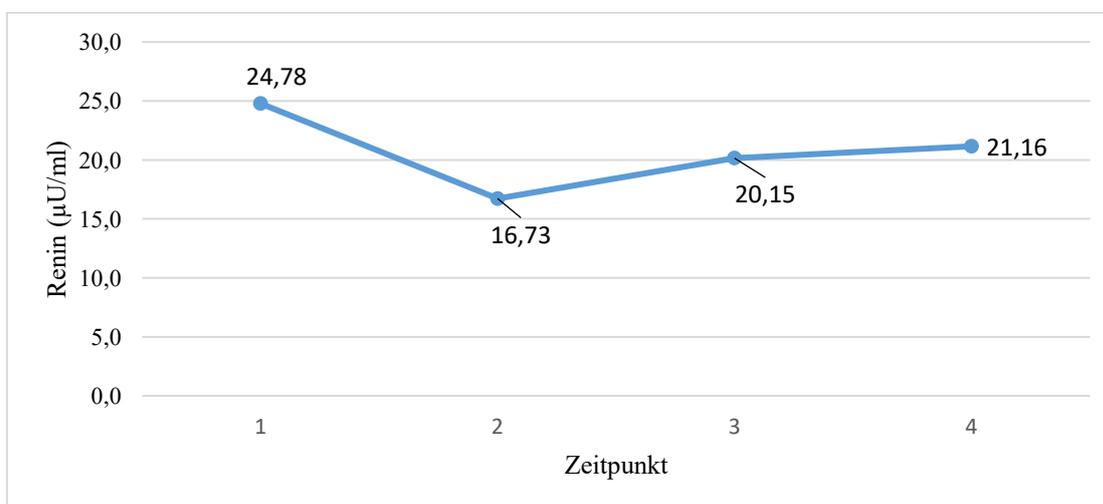


Abbildung 34. Verlauf des mittleren Renins während der oralen Wasserbelastung.

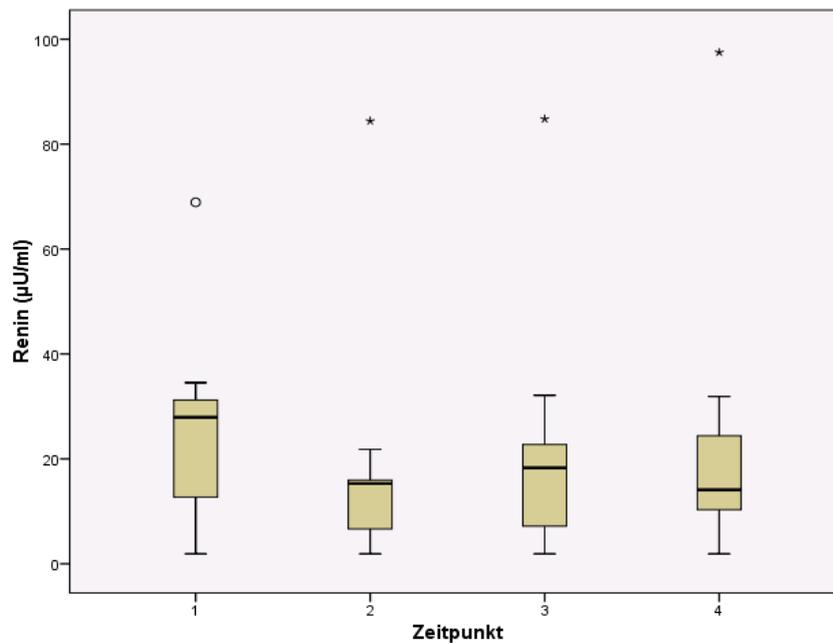


Abbildung 35. Boxplot der Reninkonzentration zu den vier Abnahmezeitpunkten während des oralen Wasserbelastungstests.

Tabelle 25. Renin während des Trinkversuchs

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	1,9	68,9	24,78	4,103	16,412	269,358
Zeitpunkt 2	16	1,9	84,4	16,73	4,748	18,993	360,741
Zeitpunkt 3	15	1,90	84,80	20,15	5,134	19,883	395,333
Zeitpunkt 4	16	1,9	97,5	21,16	5,550	22,199	492,826

Auch das Natrium zeigt einen initialen Konzentrationsabfall von 139,7 auf 135,2 mmol/l in der ersten Stunde mit nachfolgendem Wiederanstieg auf physiologische Konzentrationen von 138,3 mmol/l nach vier Stunden.

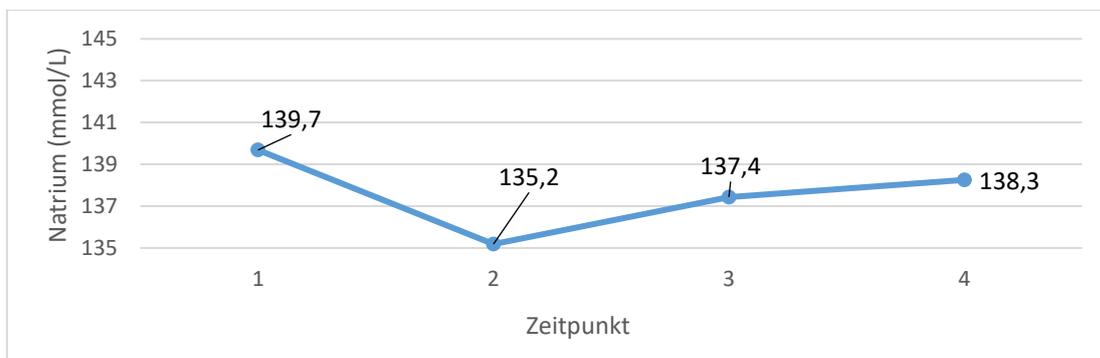


Abbildung 36. Verlauf des mittleren Natriums während der oralen Wasserbelastung

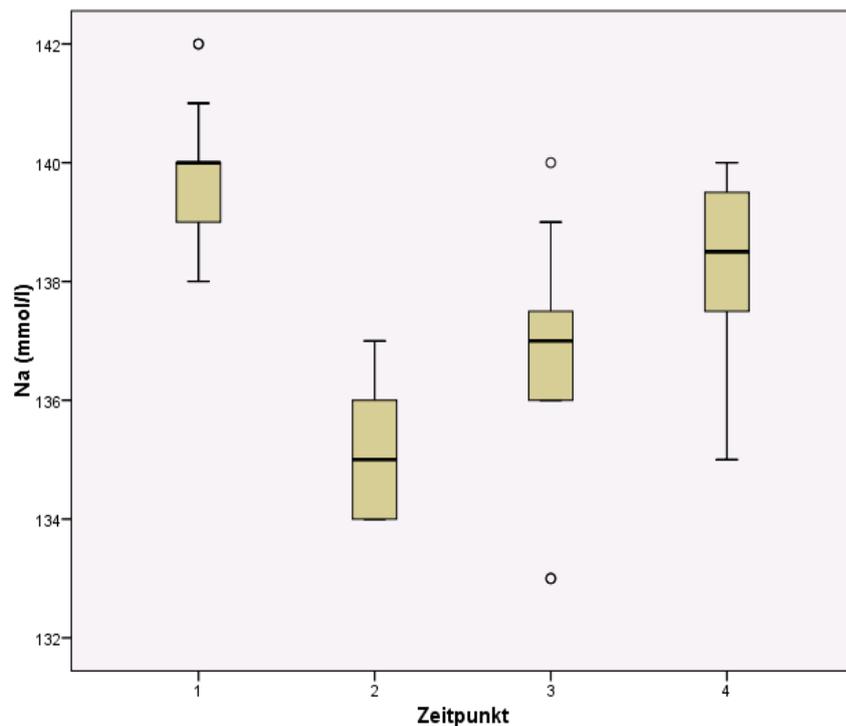


Abbildung 37. Boxplot der Natriumwerte zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.

Die mittlere Natriumkonzentration zeigt sich eine Stunde nach der oralen Wasserbelastung deutlich reduziert, was auf eine Art von Hämodilution durch hypotones Wasser schließen lassen könnte. Einen ähnlichen Verlauf zeigt sich die Gesamtproteinkonzentration. Erst nach dem 2. Abnahmezeitpunkt steigt die Natriumkonzentration wieder an.

Tabelle 26. Übersicht über die Natriumwerte (mmol/L) während der oralen Wasserbelastung.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	138	142	139,69	,313	1,250	1,563
Zeitpunkt 2	16	134	137	135,19	,262	1,047	1,096
Zeitpunkt 3	16	133	140	136,63	,455	1,821	3,317
Zeitpunkt 4	16	135	140	138,25	,403	1,612	2,600

Interessanterweise ist in den Verläufen von Renin und Natrium, ähnlich der in Abbildung 31. gezeigten Gesamtproteinkurve, ein deutliches Tal nach einer Stunde mit konsekutivem Wiederanstieg sichtbar. Diese spezifischen und gleichsinnigen Veränderungen könnten auf den oben beschriebenen Effekt der akuten Volumenbelastung mit Verdünnungseffekt sein.

Im Fall des Renins kann man aber auch an eine endokrine Herunterregulation bei akuter Volumenbelastung denken. Während die GFR deutlich zunimmt, im Mittel von 92,26 auf 99,27 ml/ml/1,73m², zeigt sich die Kreatininkonzentration dementsprechend sinkend (von initial 0,999 auf 0,92 mg/dl nach vier Stunden)

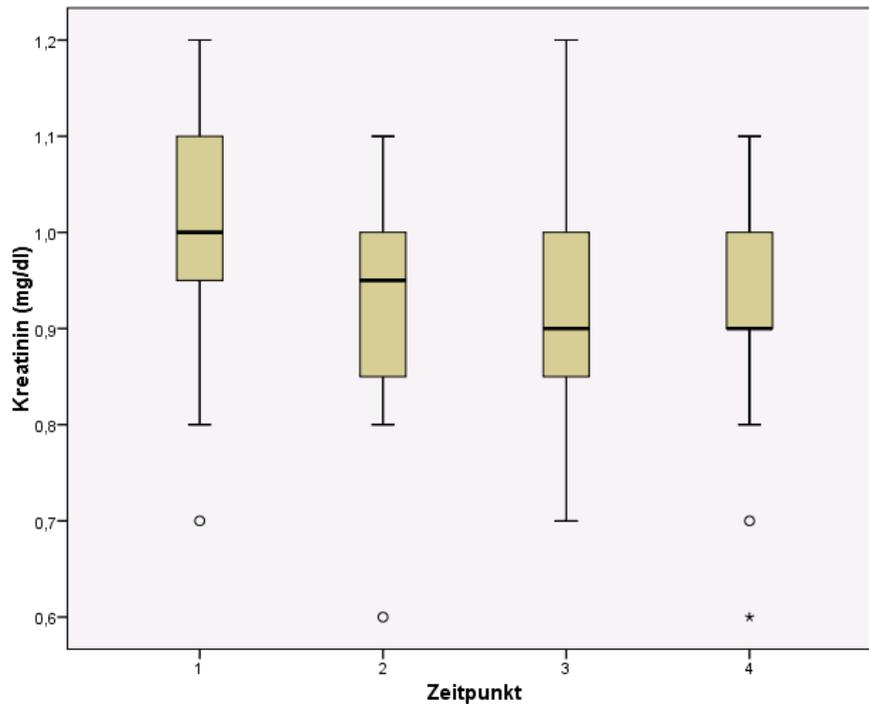


Abbildung 38. Boxplot des Kreatinins zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.

Tabelle 27. Übersicht über die Kreatininwerte (mg/dl) während der oralen Wasserbelastung.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	,7	1,2	,994	,0309	,1237	,015
Zeitpunkt 2	16	,6	1,1	,925	,0323	,1291	,017
Zeitpunkt 3	16	,7	1,2	,925	,0310	,1238	,015
Zeitpunkt 4	16	,6	1,1	,919	,0332	,1328	,018

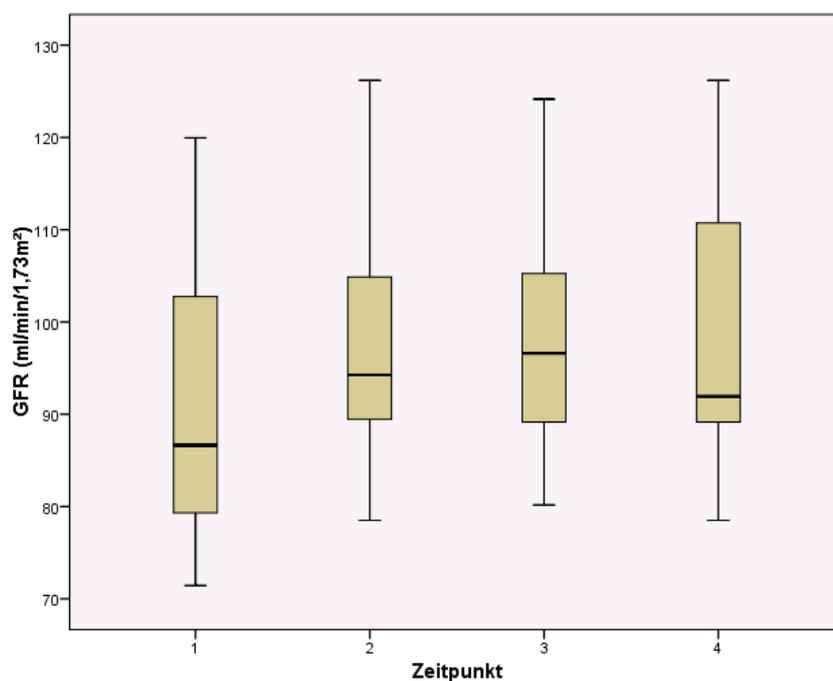


Abbildung 39. Boxplot der GFR-Werte zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.

Tabelle 28. Übersicht über die GFR im oralen Wasserbelastungstest.

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung	Varianz
Zeitpunkt 1	16	71,44	119,96	91,2663	3,68801	14,75202	217,622
Zeitpunkt 2	16	78,49	126,20	98,2388	3,67087	14,68348	215,605
Zeitpunkt 3	16	80,16	124,16	98,6844	3,36998	13,47990	181,708
Zeitpunkt 4	16	78,49	126,20	99,2719	3,94514	15,78055	249,026

Tabelle 29. zeigt die Pearson-Korrelationen zwischen FGF23 und gemessenen Parametern.

Wie in den vorangegangenen Versuchen konnte keine Korrelation zwischen FGF23 und Renin ($p=0,51$), Aldosteron ($p=0,91$), Natrium ($p=0,72$) und Kalzium ($p=0,63$) berechnet werden. Die Korrelation zwischen FGF23 und der GFR zeigte sich wiederholt negativ ($r=-0,46$), und mit einem $p=0,04$ gerade noch signifikant.

Tabelle 29. Pearson Korrelation zwischen FGF23 und den angegebenen Parametern während der oralen Wasserbelastung

Pearson	Renin	Aldosteron	Na	GFR	Ca	Gesamt-Protein
FGF23	r= -0,086 p=0,505	r= -0,014 p=0,911	r= 0,46 p=0,718	r= -0,463 p< 0,001	r= 0,61 p=0,634	r= -0,088 p=0,487

5.5. Spezielle Ergebnisse

Auch wenn man die Daten aller Versuche interpretiert, bestätigen sich einige der Ergebnisse. Sie sind also nicht nur vom jeweiligen Versuch abhängig, gewisse Konstellationen lassen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum verfolgen:

FGF23 korreliert mit der glomerulären Filtrationsrate zuverlässig negativ ($r=-0.448$) und hoch signifikant ($p<0,001$).

Weitere Korrelationen finden sich in Tabelle 30. Signifikante Korrelationen konnten mit Ausnahme der GFR mit keinem der gemessenen Parameter berechnet werden. Auffällig ist jedoch die konsequente negative Korrelation zwischen FGF23 und PTH, wenn auch in dieser Studie ohne Signifikanzniveau.

Tabelle 30. Pearson Korrelation zwischen FGF23 und den aufgeführten Parametern, berechnet über alle Versuche.

	Renin	Aldosteron	GFR	Ca	Gesamt Protein	PTH	Na	ANP	AVP
FGF23	r=-0,28 p=0,680	r=0,01 p=0,886	r=- 0,448 p<0,001	r= 0,118 p= 0,078	r= 0,052 p=0,441	r= - 0,196 p=0,141	r=0,001 p=0,984	r= - 0,047 p=0,773	r= - 0,198 p=0,137

Es besteht weiterhin keine Korrelation mit Renin ($p=0,68$), Aldosteron ($p=0,89$), Natrium ($p=0,98$), ANP ($p=0,77$) und AVP ($p=0,14$) genauso wie mit dem Serum-Gesamtprotein ($p=0,441$).

Im Bezug auf die gemessenen Phosphatkonzentration im Serum zeigt FGF23 eine signifikante, positive Korrelation von $r=0,271$ ($p<0,001$), zum gemessenen Phosphat im Urin eine zwar nicht-signifikante, aber zu erwartend negative Korrelation ($r=-0,041$,

$p=0,675$).

Zur Genaueren Bestimmung der GRF aus Kreatinin wurde die CKD-EPI-Formel verwendet (siehe „Material und Methoden“).

In den einzelnen Versuchen konnte diese negative Korrelation ebenfalls gefunden werden. Tabelle 31. schlüsselt die Korrelationskoeffizienten Zwischen FGF23 und der GFR nach den einzelnen Versuchen auf:

Tabelle 31. Korrelation nach Pearson zwischen FGF23 und der GFR in den drei einzelnen Versuchsaufbauten.

Versuch	Kochsalzbelastung	Furosemidtest	Wasserbelastung
FGF23/GFR	$r= -0,885$ $p<0,001$	$r= -0,3$ $p<0,05$	$r= -0,92$ $p<0,05$

5.6. FGF 23 und das RAAS

In den Versuchen konnte keine signifikante Korrelation zu den Hormonen dieses Regelkreises berechnet werden. Es zeigt sich allerdings zumindest grafisch eine Ähnlichkeit im Verlauf der Kurven von FGF23 und Aldosteron (vgl. Abbildungen 40. und 41.). Im Kochsalzbelastungstest nahmen sowohl FGF23 als auch Renin und Aldosteron signifikant ab.

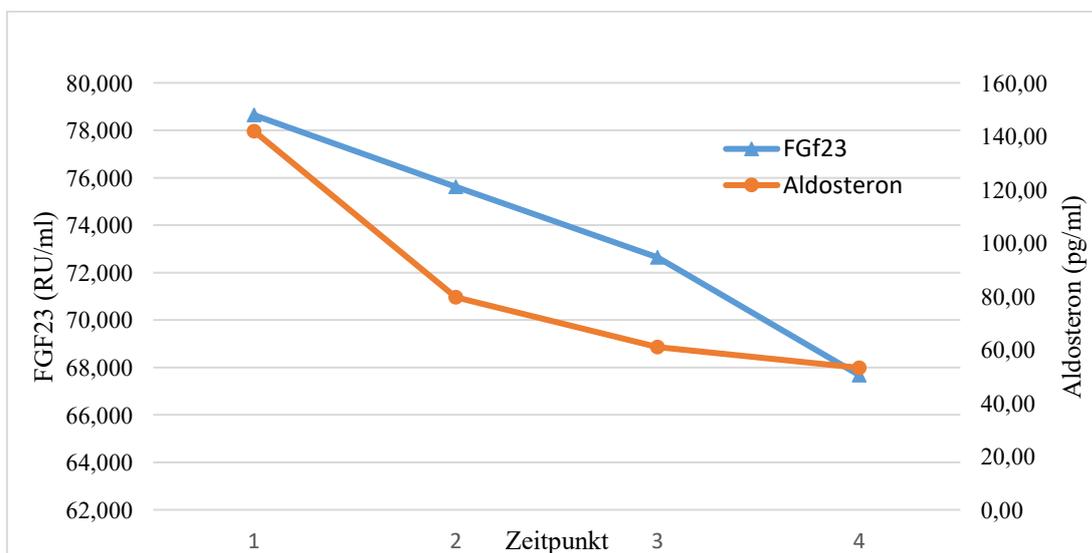


Abbildung 40. Vergleich der Verlaufskurven von FGF23 und Aldosteron im Kochsalzbelastungstest

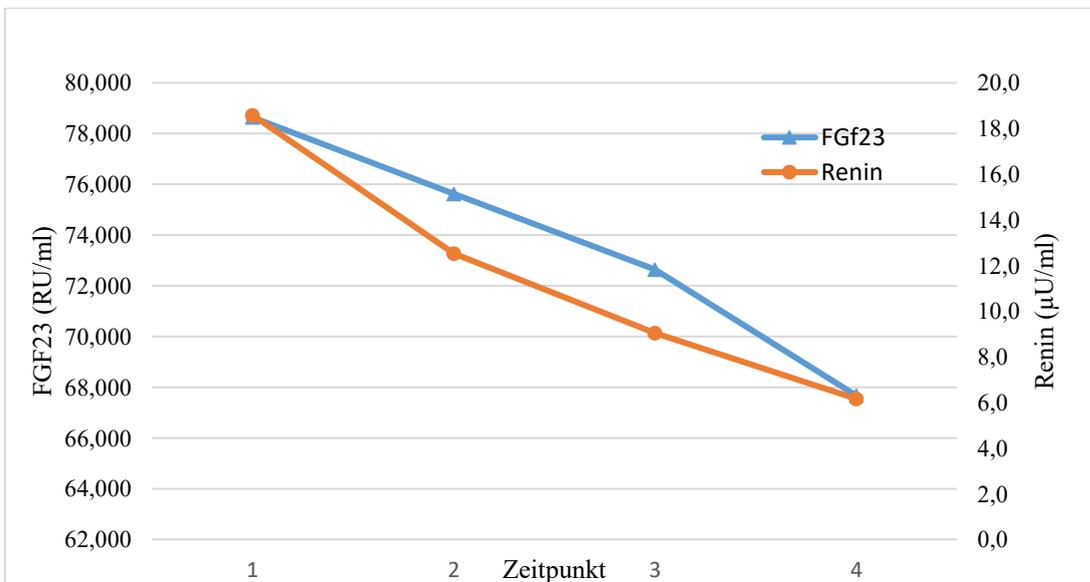


Abbildung 41. Vergleich der Verlaufskurven von FGF23 und Renin im Kochsalzbelastungstest

Im Kochsalzbelastungstest zeigt sich demnach ein ähnlicher, gleichsinniger Konzentrationsabfall im Verlauf des Versuches von FGF23 von 78,64 auf 67,67 RU/ml im Vergleich zu Aldosteron (von 141,9 auf 53,22 pg/ml) und Renin (von 18,58 auf 6,16 pg/ml) (vgl. Abbildungen 44. und 45.)

Im Gegensatz dazu zeigt sich der grafische Verlauf von FGF23 und Aldosteron im Furosemidtest nur zwischen den Abnahmezeitpunkten 2 und 3 gleichsinnig, während ein augenscheinlich gleichsinnig gerichteter Konzentrationsanstieg von FGF23 (79,2 auf 81,43 RU/ml) und Renin (von 14,2 auf 28 µU/ml) zu verzeichnen ist.

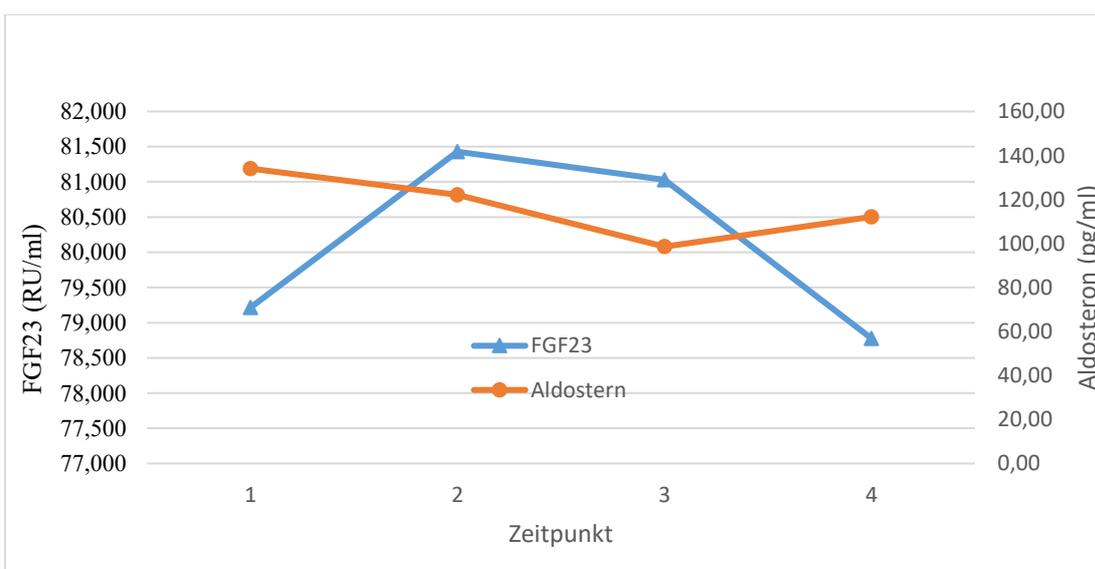


Abbildung 42. Vergleich der Verläufe von FGF23 und Aldosteron während des Furosemidtests

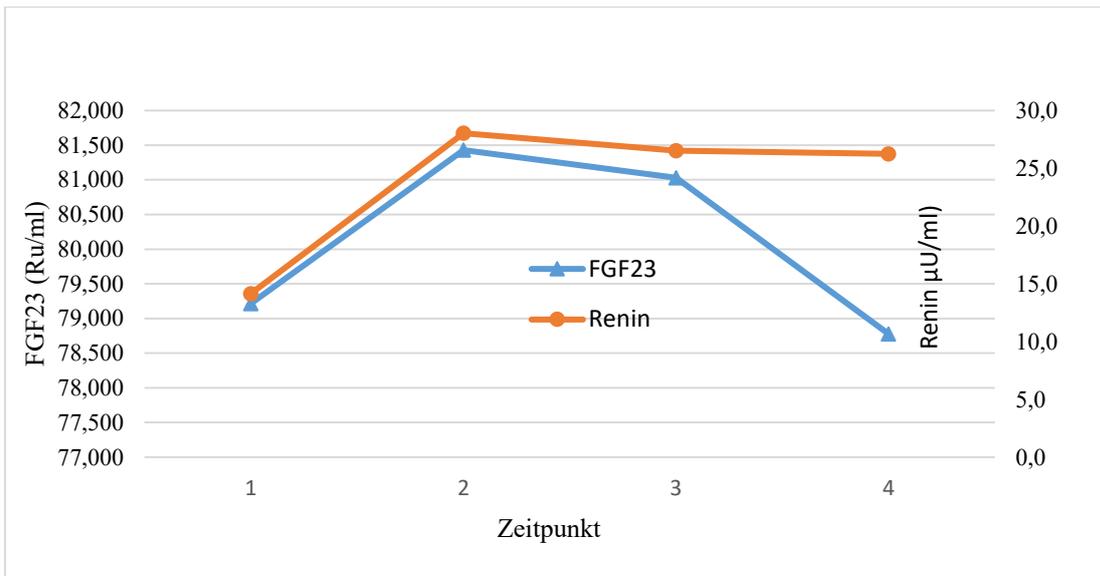


Abbildung 43. Vergleich der Verläufe von FGF23 und Renin während des Furosemidtests

Während das Renin nach dem initialen Anstieg relativ konstant erhöht bleibt (28 µU/ml zum Zeitpunkt 2 und 26,3 µU/ml im Vergleich zum Ausgangswert von 14,2 µU/ml), fällt FGF23 schon zwischen dem zweiten und dritten Abnahmezeitpunkt von 81,43 auf 81,03 RU/ml und deutlicher zum vierten Abnahmezeitpunkt auf 78,77 RU/ml, sogar unter den Ausgangswert.

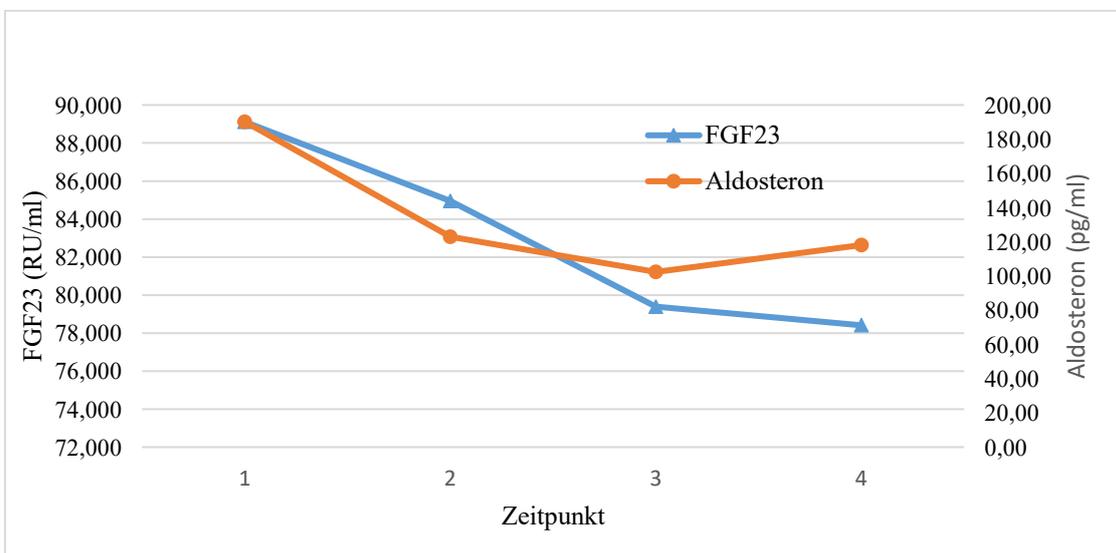


Abbildung 44. Verläufe für FGF23 und Aldosteron während des Wasserbelastungstests

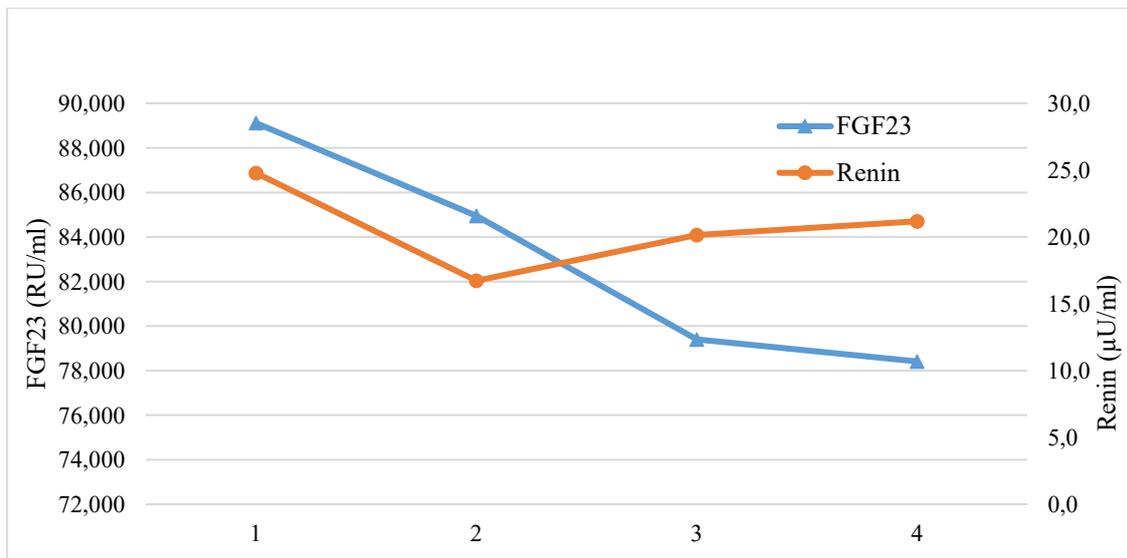


Abbildung 45. Verläufe für FGF23 und Renin während des Wasserbelastungstests

Über alle Versuche zeichnet sich ein ähnlicher Verlauf der Renin und FGF23 Spiegel ab (vgl. Abbildungen 41. und 43.) und zumindest innerhalb der ersten Stunde während des Wasserbelastungstests (vgl. Abbildung 45.). Es liegt nur ein gewisser Unterschied in den Scheitelpunkten, was durchaus durch einen Unterschied in der Expressionsgeschwindigkeit und der Halbwertszeit der Hormone liegen kann.

Da Renin physiologisch Hand in Hand mit Aldosteron verlaufen sollte, ist es nicht verwunderlich, dass diese Beobachtungen auch für den Vergleich zwischen Aldosteron und FGF23 gilt (vgl. Abbildungen 40. und 44.).

Einzig der Verlauf des Aldosterons im Furosemidtest (vgl. Abbildung 42.) passt nicht zu dieser Beobachtung. Hier fällt der Aldosteronspiegel ab. Physiologisch wäre allerdings ein Anstieg, wie er bei der Reninkurve (vgl. Abbildung 43.) gezeigt wird. Hier verlaufen Renin und FGF23 in den ersten drei Stunden nahezu parallel.

Tabelle 32. Korrelation zwischen FGF23 und Aldosteron über alle gemessenen Werte

		FGF-23	Aldosteron (pg/ml)
FGF-23	Korrelation nach Pearson	1	,010
	Signifikanz (2-seitig)		,886
	N	223	220
Aldosteron (pg/ml)	Korrelation nach Pearson	,010	1
	Signifikanz (2-seitig)	,886	
	N	220	221

Tabelle 33. Korrelation zwischen FGF23 und Renin über alle gemessenen Werte

		FGF-23	Renin (µU/ml)
FGF-23	Korrelation nach Pearson	1	-,028
	Signifikanz (2-seitig)		,680
	N	223	219
Renin (µU/ml)	Korrelation nach Pearson	-,028	1
	Signifikanz (2-seitig)	,680	
	N	219	219

Während Tabelle 32. die Berechnung des pearsonschen Korrelationskoeffizienten zwischen FGF23 und Aldosteron anzeigt, zeigt Tabelle 33. dies für die Korrelation zwischen FGF23 und Renin. Hierbei zeigt sich, gemessen über alle Versuche nahezu keine Korrelation zwischen FGF23 und Renin ($r=-0,028$; $p=0,68$) und FGF23 Aldosteron ($r=0,01$; $p=0,886$).

6. Diskussion der Ergebnisse

In folgendem Kapitel werden Teile der oben aufgeführten Ergebnisse genauer beleuchtet, mögliche Zusammenhänge skizziert und mögliche Störfaktoren diskutiert.

6.1. Der Kochsalzbelastungstest

Durch die Infusion von 2 l Kochsalzlösung wurden neben dem Volumen auch die dazugehörigen Salze infundiert. Während des Versuches wurden die Natriumkonzentrationen der Probanden in den physiologischen Grenzen gehalten, zeigten aber dennoch einen signifikanten Konzentrationsanstieg ($p=0,019$). Auch die GFR zeigt sich im Versuchsverlauf veränderlich. Sie nimmt innerhalb der ersten zwei Stunden zu und bleibt dann relativ konstant. Diese Zunahme der glomerulären Filtrationsleistung kann mit einem Anstieg des intravasalen Volumens und damit des Blutdrucks und einer konsekutiv höheren Nierendurchblutung erklärt werden, zusammen mit einem Überangebot an Kochsalz, das reguliert werden muss. Hierzu würde die signifikante ($p=0,0005$) Erhöhung der Natrium Ausscheidung passen (von 87,9 auf 129,9 mmol/l). Anders als erhofft zeigt sich im Versuch der akuten, kontinuierlichen Volumen- und Elektrolytbelastung der Probanden kein statistisch beweisbarer Zusammenhang zwischen Renin, Aldosteron, Natrium und AVP mit FGF23.

Andererseits zeigt sich eine signifikante leichte, negative Korrelation von FGF23 zu PTH. Während manche Studien PTH eine stimulierende Komponente in der FGF23 Expression

zuschreiben (Lanske & Razzaque, 2014), postulieren andere wiederum eine hemmende Wirkung von FGF23 auf die PTH Expression (Olauson et al., 2013). Generell ist also eine Art regulatorisches Gegenspielerprinzip zwischen FGF23 und PTH beschrieben, das über verschiedenartige und heute noch nicht vollkommen verstandene Mediatorsysteme funktioniert. Hierzu würde natürlich auch die gefundene negative Korrelation passen.

Eine weitere Theorie basiert auf dem reaktiven PTH-Anstieg bei der volumeninduzierten kurzzeitigen Hypokalzämie. Hier wird wieder ein gewisser Verdünnungseffekt postuliert, der sich durch den Konzentrationsabfall von Kalzium an den entsprechenden Rezeptoren in einer reaktiven Erhöhung des PTH auswirkt.

Auch mit der glomerulären Filtrationsrate konnte eine signifikante, negative Korrelation gefunden werden. Die FGF23 Aktivität zeigt sich also fallend, während die GFR steigt.

Auch diese Beobachtung kann natürlich im Rahmen des Versuches an sich erklärt werden. Durch die Volumenbelastung wird die FGF23 Konzentration verdünnt und sinkt deswegen, während die GFR, über Osmo- und Druckrezeptoren getriggert, gesteigert wird. Trotzdem entspricht dieser gefundene Zusammenhang dem derzeitigen physiologischen und pathophysiologischen Verständnis, allein wenn man sich die gesteigerten FGF23 Werte bei abnehmender Nierenfunktion (abnehmender GFR) in Erinnerung ruft. Natürlich könnte diese Beobachtung auch mit einer möglichen Elimination von FGF23 über renale Verstoffwechslung und Ausscheidung erklärt werden.

Die Urinausscheidung in diesem Versuch zeigte sich interessanterweise am Geringsten (Mittelwert 507,5ml; min. 120ml, max. 1150ml) im Vergleich mit den anderen Versuchen. Das könnte durch die Infusion der isotonen Lösung zu erklären sein. Demnach würde die infundierte Flüssigkeitsmenge über die gebundenen Elektrolyte im Körper aufgenommen ohne per se als Volumenbelastung verarbeitet zu werden. Eine Beobachtung, die man im klinischen Alltag des Öfteren bei Patienten nach forcierter Infusionstherapie (Intraoperativ, durch Intensivaufenthalte oder bei Sepsistherapie) beobachten kann. Hier zeigt sich eine deutliche Gewichtszunahme, teilweise ohne drastische Erhöhung der Urinausscheidung.

6.2. Der Furosemidtest

Durch die Steigerung der renalen Natriumausscheidung wurde hier, reziprok zum Kochsalzbelastungstest, versucht Einfluss auf die steuernden Mechanismen und Hormone durch Absenken der Serumnatriumkonzentration zu nehmen. Im klinischen Alltag wird mit Furosemid eine Steigerung der Urinproduktion und damit eine Volumenreduktion bewirkt. So würde sich also, bei Volumenreduktion ein Konzentrationsanstieg der nicht direkt betroffenen Elektrolyte und Eiweiße feststellen lassen. Im Vergleich des Verlaufs der gemittelten FGF23-Konzentration mit dem Verlauf für das Gesamtprotein zeigt sich ein FGF23 Peak nach einer Stunde und ein gradueller Abfall bis unterhalb des Ausgangswertes nach vier Stunden. Gerade im letzten Drittel zeigt sich im Vergleich mit dem Gesamtprotein ein erheblicher Unterschied. Während beide Kurven am Anfang ansteigen, was durchaus auch durch eine Volumenreduktion und folglich Konzentration im Serum erklärbar wäre, zeigt sich das Gesamtprotein stabil bei einer Konzentrationssteigerung von fast 8% gegenüber dem Ausgangswert, während die FGF23-Konzentration wieder deutlich sinkt.

Dies kann man als Hinweis auf eine Entkopplung dieser beiden Parameter durch steuernde Mediatoren verstehen.

Im klinischen Furosemidtest sollte Aldosteron ebenfalls wie Renin auf das zwei- bis sechsfache der basalen Konzentration ansteigen.

Aldosteron verhält sich allerdings entgegen dem erwarteten Verlauf. Dieser gezeigte Abfall, der in einem klinischen Furosemidtest auf einen primären Hyperaldosteronismus hinweisen könnte, könnte hier mit eventuellen Störeinflüssen, beziehungsweise Fehlern im Versuchsprotokoll erklärt werden. Eventuell war die geforderte Orthostase nicht von allem Probanden gleich eingehalten worden. Oder ein Umhergehen durch die Probanden nicht adäquat durchgeführt worden. Vielleicht war für eine adäquate Aldosteronstimulation auch die Dosis von Furosemid zu gering. Diesbezüglich wirft das Ausbleiben einer physiologischen Reaktion natürlich auch die Frage auf, ob der Versuch und die Bestimmung der restlichen Parameter als verlässlich und aussagekräftig zu bewerten ist.

Wie auch im ersten Versuch wird die Natriumkonzentration im physiologischen Bereich gehalten. Eine signifikante Änderung ist hier nicht nachweisbar. Auch hier könnte die natriuretische Wirkung durch die reduzierte Furosemiddosis eingeschränkt sein.

Eine neuere Studie (Andrukhova et al., 2014) belegt, dass FGF23 die Expression eines Natrium-Chlorid-Kotransporters im distalen Tubulussystem fördert.

Diese Studie an Mäusen zeigte, dass ein Stimulus mit rekombinantem FGF23 (rFGF23) die Natriumresorption über diesen Transporter erhöht, und damit auch den Blutdruck und das kardiovaskuläre Risiko der Tiere in die Höhe trieb. Dieser Transporter ist medikamentös mit Hydrochlorothiazid blockierbar, was in oben genannter Studie die von FGF23 ausgelösten Effekte deutlich reduzierte. Unser Versuch zielte allerdings auf einen anderen Transporter ab, den oben erwähnten Natrium-Kalium-2-Chlorid-Transporter; ein umgekehrter Effekt auf die endogene FGF23-Produktion konnte aber auch in den Experimenten von Adrukhova et al. (2014) nicht nachgewiesen werden.

Der normale klinische Effekt von Furosemid im Vergleich zu Chlorothiaziden ist im Bezug auf die entwässernde Wirkung zwar meist höher, dennoch gelang es uns nicht den Natriumhaushalt signifikant zu verändern.

Das pathologische Verhalten von Aldosteron könnte darauf schließen lassen, dass der Test nicht richtig angewendet wurde, sei es durch ungenügendes Probandenverhalten, sei es durch eine zu niedrige oder falsche Dosierung des eingesetzten Medikaments.

Klinisch zeigte sich allerdings ein gutes Ansprechen der Probanden auf das harntreibende Medikament.

Trotz der geringen Menge von 20mg Furosemid zeigte sich dennoch eine deutlich erhöhte Urinsammelmenge im Vergleich zum Kochsalzbelastungstest.

Die mittlere Sammelmenge betrug 1253,5 ml (min. 650 ml, max. 1750 ml), Das Ausscheidungsmaximum erfolgte innerhalb der ersten zwei Stunden post infusionem.

6.3. Der orale Wasserbelastungstest

In diesem Versuch ist ähnlich wie im vorangegangenen Furosemidtest der Verlauf der Gesamteiweißkonzentration sehr interessant. Die Proteinkurve zeigt einen deutlichen Knick, nach der ersten Stunde, ganz ähnlich zum Kurvenverlauf von Renin und Natrium. Dieser könnte durch einen Abfall des Antidiuretischen Hormons (ADH) innerhalb der ersten Stunde nach der akuten Hyperhydratation durch die orale Wasserbelastung sein, mit konsekutivem Wiederanstieg nach Abklingen des Effekts. Generell wurde das überflüssige Volumen innerhalb einer Stunde zum größten Teil wieder ausgeschieden. Der harntreibende Effekt war dabei sogar größer als nach Furosemidinfusion und deutlich größer im Vergleich zur intravenösen Kochsalzbelastung. Die mittlere Sammelmenge betrug 1310 ml (min. 400 ml, max. 2000 ml).

Der größte Anteil an der Ausscheidungsmenge konnte innerhalb der ersten zwei Stunden beobachtet werden.

Während das Gesamtprotein einen relativ schnellen und steilen Abfall zeigt, entwickelt FGF23 einen langsameren, flacheren aber beständigen negativen Kurvenverlauf. Auch zu dem Zeitpunkt, an dem die mittlere Gesamtproteinkonzentration einen Wiederanstieg zeigt, verläuft das FGF23 weiterhin absinkend. Somit ist hier eine gewisse Unabhängigkeit der beiden Kurvenverläufe und auch eine verdünnungsunabhängige Wirkung auf den FGF23 Spiegel zu postulieren. Dies könnte mit dem volumenbedingten Abfall des Aldosterons zusammenhängen. Eine gleichsinnige Entwicklung der beiden Proteine wurde schon im Kochsalzbelastungstest gezeigt.

Im oralen Wasserbelastungstest zeigt sich ebenfalls ein gleichsinniger Kurvenverlauf von FGF23 und Aldosteron.

6.4. FGF23 und das Renin-Aldosteron-System

Eine der Hauptaufgaben dieser Studie war es, eine Verbindung zwischen dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System als Vertreter der Blutdruckregulation und FGF23 herauszufinden. Eine aktuelle Studie beschreibt einen stimulatorischen Effekt von Aldosteron auf die FGF23 Produktion (Zhang et al., 2016). Hier wurde im Tierversuch an Mäusen nach Gabe von Deoxycortisonacetat sowohl eine Erhöhung des c-terminalen FGF23-Spiegels beobachtet als auch eine vermehrte Aktivität von FGF23 mRNA in der Knochenmatrix der Tiere. Ein ähnliches Ergebnis wurde beobachtet nachdem die Tiere eine zweiwöchige Diät mit niedrigem Kochsalzgehalt bekamen.

Aufgrund der künstlich herbeigeführten Salzrestriktion stieg der endogene Aldosteronspiegel und auch die FGF23-Konzentration. Eine direkte oder indirekte Verbindung zwischen FGF23 und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird immer wieder postuliert.

Das RAAS ist einer, wenn nicht der wesentliche Regulator unseres Volumen- und Blutdruckhaushaltes. Liegt hier eine Störung vor, kommt es zum Beispiel zu ausgeprägten Hypertonien, mit dem konsekutiven Risiko sekundärer Schäden an den Kreislauforganen. Angefangen bei den Nieren selber, die aufgrund der höheren Drücke vermehrt Protein filtern und somit ihren Filterapparat nachhaltig schädigen, über das Gefäßsystem, das an die chronisch erhöhten Drücke adaptieren muss, bis hin zum Herz. Hier seien beispielshalber nur die Linksherzhypertrophie, Klappendeformationen, Aneurismata und Kardiomyopathie als Folgeerkrankungen einer chronischen Hypertonie benannt.

Wie eingangs erwähnt zeigt sich hier auch FGF23 als Teil des großen Ganzen, wenn es um Herz-Kreislaufkrankungen geht.

Einige Studien zeigen FGF23 als Biomarker chronischer Herzerkrankungen (Ali, Falkner et al. 2014); (Scialla, Xie et al. 2013), und linksventrikulärer Hypertrophie (Faul, Amaral et al. , Grabner, Amaral et al.); (Jovanovich, Ix et al. 2013).

Des Weiteren hatte sich FGF23 nicht nur als Phosphatonin im Zusammenspiel mit Klotho gezeigt, sondern auch als Aktivator einer gesteigerten Natrium-Reabsorption aus dem proximalen Tubulus (Andrukhova, Slavic et al. 2014), einer Zielstruktur des RAAS. Andererseits wird FGF23 im Fall einer Niereninsuffizienz, durch die dann erhöhte Phosphatausscheidung durchaus auch als protektiver Faktor in Bezug auf Gefäßverkalkung diskutiert.

Andere Studienergebnisse (de Seigneux and Martin) zeigten zum Beispiel, dass RAAS-Aktivierung zu einer Klotho Hemmung und eine RAAS-Blockade mit ACE-Hemmern (z.B. Ramipril) und AT1-Blockern (Sartane; wie sie in der chronischen Niereninsuffizienz zur Verringerung der Proteinurie und folglich Nephroprotektion und auch zur Kardioprotektion bei Herzerkrankungen verwandt werden) dagegen eine gesteigerte Klotho-Expression zur Folge hat.

Trotz der vielen Hinweise, dass RAAS und FGF23 eng verknüpft sind, und sich diese Faktoren des Öfteren zu überschneiden scheinen, konnte in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zu den Hormonen dieses Regelkreises berechnet werden. Es zeigt sich zumindest grafisch eine Ähnlichkeit im Verlauf der Kurven von FGF23 und Aldosteron. Im Kochsalzbelastungstest nahmen sowohl FGF23 als auch Renin und Aldosteron signifikant ab. Über alle Versuche zeichnet sich ein ähnlicher Verlauf der Renin und FGF23 Spiegel ab und zumindest innerhalb der ersten Stunde während des Wasserbelastungstests. Es liegt nur ein gewisser Unterschied in den Scheitelpunkten, was durchaus durch einen Unterschied in der Expressionsgeschwindigkeit und der Halbwertszeit der Hormone liegen kann.

Da Renin physiologisch Hand in Hand mit Aldosteron verlaufen sollte, ist es nicht verwunderlich, dass diese Beobachtungen auch für den Vergleich zwischen Aldosteron und FGF23 gilt. Einzig der Verlauf des Aldosterons im Furosemidtest passt nicht zu dieser Beobachtung. Hier fällt der Aldosteronspiegel ab. Physiologisch wäre allerdings ein Anstieg, wie er bei der Reninkurve gezeigt wird. Hier verlaufen Renin und FGF23 in den ersten drei Stunden nahezu parallel.

Warum sich Aldosteron im Mittel und auch in dem Großteil der Einzelbeobachtung verhält, wie bei einem klinisch-pathologischem Testergebnis (z.B. einem Aldosteron produzierenden Adenom), kann nur gemutmaßt werden. Eventuell ist die Dosis von 20mg Furosemid zu gering, um einen stimulatorischen Effekt auf Aldosteron auszuüben.

Auch wenn die hier durchgeführten Berechnungen keine Korrelation zeigen konnten, ist aus dem Kurvenverlauf und den bisherigen Forschungsergebnissen eine Überschneidung und gegenseitige Beeinflussung des RAAS und des FGF23 nicht von der Hand zu weisen. Hier sollte sicherlich in einer größeren Versuchsgruppe gezielt auf diese Parameter geforscht werden.

Hier bieten sich Langzeitstudien bei Hypertoniepatienten an, bei denen z.B. eine ACE-Hemmer oder AT1-Blocker Therapie initiiert wird. Zum Vergleich könnte man ebenfalls Patienten mit einem primären oder sekundären Hyperaldosteronismus einbeziehen.

Auch zu Renin ließ sich keine signifikante Korrelation errechnen. Trotzdem lässt sich aus den einzelnen oben gezeigten Kurvenverläufen zumindest in einzelnen Abschnitten eine gewisse Gleichsinnigkeit der Parameter ableiten. Ob dies eine physiologische Ursache zu Grunde hat, oder hier eine zufällige, optische Kongruenz besteht lässt sich aus den in dieser Studie erhobenen Daten leider nicht zweifelsfrei errechnen.

6.5. FGF23 und Parathormon

Das Parathormon und FGF23 sind beides mächtige Regulatoren im Phosphathaushalt, indem sie beide die Phosphatexkretion über die Niere steuern.

Das Parathormon aus den Nebenschilddrüsen reguliert nicht nur den Kalziumhaushalt des Menschen, sondern auch den daran gekoppelten Phosphathaushalt. Zusammen mit Vitamin D bildeten die beiden Hormone lange Zeit einen festen Regelkreis in der Regulation des Kalzium-Phosphat Haushaltes des Menschen; eine Verbindung, die insbesondere bei chronischer Niereninsuffizienz, daraus resultierendem Mangel an Vitamin D Synthese, verringerter Phosphatausscheidung und folgendem sekundärem Hyperparathyreoidismus Beachtung in Klinik und Forschung gefunden hat (Habicht & Watschinger, 2001).

In der Niere, genauer im proximalen Tubulus, hemmt PTH die Aktivität eines Natrium-Phosphat-Kotransporters, und reduziert hiermit die Phosphatreabsorption aus dem Primärharn. Hier kommt auch FGF23 ins Spiel, indem es genau diesen Transporter ebenfalls negativ beeinflusst (vgl. Blau, J., & Collins, M., 2015). Der wesentliche Unterschied der beiden Hormone in der Niere ist der Einfluss auf die Vitamin-D Synthese. FGF23 hemmt (Krajisnik et al., 2007), PTH fördert die 1-alpha-Hydroxylase der Niere die aus 25-Hydroxyvitamin D (Calcidiol), 1,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitriol, aktiviertes Vitamin D, Vitamin D3) synthetisiert. Gegenregulatorisch wirkt Calcitriol hemmend auf die Sekretion von Parathormon. Diese beiden funktionieren also als Regelkreis.

Die Rolle und die Funktion des FGF23 in dieser Homöostase ist hoch komplex, noch Bestandteil aktueller Forschungen und in einigen Punkten kontrovers diskutiert. Es gibt Belege, dass Parathormon aktiv die Expression von FGF23 im Knochen über die Aktivierung des Nurr1-Liganden fördert (Meir, Durlacher et al.) und FGF23 im Sinne eines negativ-regulierenden Feedback-Mechanismus seinerseits die Expression von PTH in den Nebenschilddrüsen hemmt. Weiterhin scheint das FGF23 eine protektive Wirkung auf die Knochenstruktur zu haben, indem es den Abbau durch PTH hemmt (Goetz, Ohnishi et al. 2012).

Eine Studie zeigt eine Expression von Klotho- und FGF-Rezeptoren in Nebenschilddrüsen von Ratten (Ben-Dov et al., 2007), und eine hemmende Wirkung von FGF23 auf die Parathormon- Expression und Exkretion. Somit wäre eine negativ-rückkoppelnde Wirkung von FGF23 auf die Parathormonsynthese denkbar, auch wenn ein Beweis in einer humanen in vivo Studie noch zu erbringen wäre. Auch in dieser Studie zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation zwischen FGF23 und PTH, die diese Regelkreisthese unterstützen würde.

Parathormon-Konzentrationen wurden in dieser Arbeit während des Kochsalzbelastungstests und des Furosemidtests bestimmt. Auf eine Bestimmung im Wasserbelastungstest mussten wir aus Budgetgründen leider verzichten.

Dennoch konnten wir eine konstant niedrige, aber signifikante negative Korrelation zwischen FGF23 und PTH nachweisen. Es ergab sich über alle Messwerte eine Korrelation von $r = -0,25$ mit einem hochsignifikanten $p < 0,001$.

Hieraus könnte man durchaus die Theorie über die Hemmung von FGF23 auf Parathormon unterstützen, jedoch sehr sicher einen wie auch immer gearteten negativ-rückkoppelnden Mechanismus postulieren.

Andererseits zeigt die Studie von Nilsson et al. (Nilsson, Norenstedt et al. 2016) aus dem Jahr 2016 eine deutlich erhöhte FGF23 Konzentration bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus. Höhere Konzentrationen korrelierten hier mit höheren Konzentrationen von PTH, der Adenomgröße, dem BMI, dem Triglycidgehalt und dem postoperativen Abfall nach Parathyreoidektomie. Auch interessant in dieser Studie ist die Korrelation von erhöhten Blutdruckwerten, vor allem nächtlich, und damit verbundenen erhöhten PTH und FGF23 Konzentrationen.

In diesem Sinne zeigen diese beiden Hormonsysteme einerseits eine Verbindung untereinander, als auch eine Verbindung zum Blutdruck und damit Volumen- und Salzhaushalt, also Funktionen weit über die bisher bekannten und bewiesenen Aufgaben dieser beiden Hormone hinaus.

6.6. FGF23 und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Der Zusammenhang zwischen FGF23 und der glomerulären Filtrationsrate ist sehr interessant. Während klinisch die GFR oft hinzugezogen wird, um Nierenfunktion und die Einteilung einer Niereninsuffizienz in Schweregrade zu ermöglichen, wurde FGF23 und die Veränderungen in seiner Serumkonzentration, bisher fast ausschließlich an Niereninsuffizienten untersucht.

Hier ist es so, dass mit steigender Niereninsuffizienz auch die Spiegel des FGF23 ansteigen (Larsson, Nisbeth, Ljunggren, Juppner, & Jonsson, 2003) und das Hormon sogar teilweise als unabhängiger Risikofaktor für ein schlechtes Outcome in der chronischen Niereninsuffizienz diskutiert wird (vgl. zb. Titan et al., 2011).

Eine neuere Studie zeigte, dass Nephrektomie die FGF23-Spiegel deutlich ansteigen lässt, ähnlich zu den Werten bei terminaler Niereninsuffizienz und postulierte eine tragende Rolle der Niere bei dem FGF23-Stoffwechsel (Mace, Gravesen, Hofman-Bang, Olgaard, & Lewin, 2015). Alle diese Ergebnisse wurden bei „kranken“ Versuchspersonen ermittelt und lassen auf eine negative Korrelation zwischen der GRF bzw. der Nierenfunktion und den FGF23-Spiegeln schließen. In dieser Arbeit wurde der Haushalt des FGF23 bei Gesunden untersucht. Zur Genaueren Bestimmung der GRF aus Kreatinin wurde die CKD-EPI-Formel verwendet (siehe „Material und Methoden“).

In den einzelnen Versuchen konnte diese negative Korrelation ebenfalls gefunden werden. Interessanterweise korrelieren FGF23 und die GFR stets negativ miteinander, auch bei gesunden Probanden. Zu ergründen sind die Zusammenhänge zwischen FGF23 und der Nierenfunktion.

Die Studie von Mace, Gravesen et al. (Mace, Gravesen et al. 2015) zeigt einen signifikanten FGF23 Anstieg nach Heminephrektomie und beidseitiger Nephrektomie und sieht die Niere in einer zentralen Rolle zur Regulation der FGF23 Konzentration.

Steigt FGF23 also bei Niereninsuffizienten, weil es nicht weiter abgebaut werden kann? Sollte die Niere wirklich, wie von Mace et al. gefordert, eine zentrale Rolle in der Metabolisierung von FGF23 haben? „Staut“ sich FGF23 in Niereninsuffizienten an, wie z.B. Kreatinin oder Phosphat, Harnstoff oder andere Retentionsparameter?

Ist FGF23 ein Entzündungsparameter, der bei chronischen Entzündungsreaktionen und Stress, wie sie die Niereninsuffizienz darstellt, ansteigt (Izquierdo et al., 2012; Mendoza et al., 2012)? All diese Fragen zu beantworten, würde bedeuten sich der Rolle des FGF23 vollständig bewusst zu sein, wozu wir bei aller Forschung heute noch nicht in der Lage sind. Hier müssen sicherlich noch viele Teile des Puzzles aufgedeckt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Studie weitere Einblicke und Fragestellungen zur physiologischen Funktion von FGF23 und seinen Wechselwirkungen aufgezeigt werden konnten. Diese Studie hat die Verbindung zwischen FGF23 und dem Hormon- und Volumenhaushalt bei Erwachsenen untersucht.

Sicher scheint hierbei eine enge Verknüpfung zwischen den FGF23 Spiegeln und der Nierenfunktion, ebenso wie mit dem Parathormon zu sein. Des Weiteren lässt sich eine tendenzielle Synergie mit Renin und Aldosteron erkennen, wenn auch statistisch nicht sicher nachweisbar.

Wie erwartet korreliert FGF23 signifikant negativ mit der glomerulären Filtrationsrate, auch beim gesunden Probanden. Ebenfalls scheint es eine Art negativ rückkoppelnde Wirkung zum Parathormon zu haben.

Die Haupthypothese, dass FGF23 in engem Zusammenhang mit dem Natriumhaushalt und dem RAAS steht, konnte jedoch nicht bewiesen werden. Es konnten jedoch im NaCl-Belastungstest eine signifikante Suppression von FGF23 gezeigt werden, während gleichzeitig eine signifikante Stimulation der iPTH-Freisetzung zu beobachten war. Auch durch eine Wasserbelastung war FGF23 signifikant zu vermindern.

Weitere, größer angelegte Studien können mögliche direkte Verknüpfungen bestätigen oder widerlegen. So sollte z.B. auch ein längeres Follow up berücksichtigt werden, zum Beispiel über 8 Stunden, da sich zumindest im Furosemid- und Wasserbelastungstest ein deutliches Absinken des FGF23 nach 4 Stunden zeigt, während andere Parameter sich wieder zu stabilisieren scheinen. Gegebenenfalls war der angenommene Beobachtungszeitraum hier zu knapp gewählt um eine Beeinflussung des FGF23 Systems durch getriggerte Natriumausscheidung zu messen.

6.7. Ausblick

FGF23 ist ein in der Funktion derzeit nur teilweise verstandenes Protein und Hormon, dessen Eigenschaften und Wirkungen sicherlich weit über das hinausgehen, was wir bisher erforscht haben. Wird ein hoher FGF23 Spiegel einerseits eng mit Mortalität durch Herzversagen korreliert, bei Gesunden, sowie niereninsuffizienten Personen, und gilt FGF23 auch andernorts als Prädiktor für Outcome im Sinne von Komplikationsentstehung und sogar Mortalität bei Patienten, die eine Herzoperation durchlaufen sollen (Speer, Groesdonk et al. 2015), so lässt doch ein Tierversuch, in dem FGF23 durch Antikörper komplett ausgeschaltet wurde erkennen, dass der Körper ganz ohne FGF23 nicht überleben kann (Kovesdy 2014). Ähnliches gilt für Klotho. Ein Knockout-Tierversuch zeigte Phänotypen mit deutlichen Alterungserscheinungen, Vitamin D Überschuss, Hyperphosphatämie und deutlich kürzerer Lebenserwartung (Fukumoto 2014).

Faktisch lässt sich trotzdem ein großer Zusammenhang zwischen FGF23, Parathormon, dem Natriumhaushalt und somit auch dem Blutdruck und dessen bekannten regulierenden Elementen vermuten, wenn man die vielen kleinen Puzzleteilchen zusammensetzt, die die Wissenschaft bisher entdeckt hat. Denn dass FGF23 auch die Natriumausscheidung in der Niere regulieren kann, dass es eine wechselseitige Beeinflussung mit Vitamin D und Parathormon gibt, und dass diese beiden Hormone eng mit dem Natriumhaushalt und dem RAAS verknüpft sind steht bislang außer Frage.

Zu beweisen, und das ist in einem komplexen System wie dem Menschen sicherlich immer die schwierigste Aufgabe, ist das wie. Hier werden sicherlich noch viele Arbeiten notwendig sein, die viele kleinere und größere Puzzleteile liefern, um irgendwann das große Bild zusammensetzen und verstehen zu können.

7. Quellenverzeichnis

- Ali, F. N., et al. (2014). Fibroblast Growth Factor-23 in Obese, Normotensive Adolescents is Associated with Adverse Cardiac Structure. *The Journal of pediatrics* 165(4): 738-743.e731.
- Andrukhova, O., Smorodchenko, A., Egerbacher, M., Streicher, C., Zeitz, U., Goetz, R., ... Erben, R. G. (2014). FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *The EMBO journal*, 33(3), 229–246. doi:10.1002/emboj.201284188
- Andrukhova, O., Slavic, S., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Shalhoub, V., Lanske, B., . . . Erben, R. G. (2014). FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Molecular Medicine*, 6(6), 744-759. doi:10.1002/emmm.201303716
- Andrukhova, O., Zeitz, U., Goetz, R., Mohammadi, M., Lanske, B., & Erben, R. G. (2012). FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2–SGK1 signaling pathway. *Bone*, 51(3), 621-628. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.05.015>
- Ben-Dov, I. Z., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., . . . Silver, J. (2007). The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 4003-4008. doi:10.1172/JCI32409
- Blau, J., & Collins, M. (2015). The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(2), 165-174. doi:10.1007/s11154-015-9318-z
- Block, G. A., et al. (2012). Effects of Phosphate Binders in Moderate CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(8): 1407-1415.
- de Borst, M. H., et al. (2011). Cross Talk Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Vitamin D-FGF-23-klotho in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(9): 1603-1609.
- de Seigneux, S., & Martin, P.-Y. (2016). Phosphate and FGF23 in the renoprotective benefit of RAAS inhibition. *Pharmacological Research*.
- Ding, H.-Y., & Ma, H.-X. (2015). Significant roles of anti-aging protein klotho and fibroblast growth factor23 in cardiovascular disease. *Journal of Geriatric Cardiology : JGC*, 12(4), 439-447. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.04.017
- Faul, C., Amaral, A. P., Oskouei, B., Hu, M.-C., Sloan, A., Isakova, T., . . . Wolf, M. (2011). FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4393-4408. doi:10.1172/JCI46122
- Fukumoto S. (2014). What can FGF23 do without Klotho?. *BoneKEy reports*, 3, 551. doi:10.1038/bonekey.2014.46
- Goetz, R., et al. (2012). Conversion of a Paracrine Fibroblast Growth Factor into an Endocrine

- Fibroblast Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34): 29134-29146.
- Grabner, A., Amaral, Ansel P., Schramm, K., Singh, S., Sloan, A., Yanucil, C., . . . Faul, C. (2015). Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metabolism*, 22(6), 1020-1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
- Habicht, A., & Watschinger, B. (2001). Parathormon und Kalzium-Phosphat-Stoffwechselstörungen bei chronischer Niereninsuffizienz. *Journal für Mineralstoffwechsel*, 8(1), 18-21.
- Itoh, N., Ohta, H., & Konishi, M. (2015). Endocrine FGFs: evolution, physiology, pathophysiology, and pharmacotherapy. *Frontiers in Endocrinology*, 6. doi:10.3389/fendo.2015.00154
- Izquierdo, M. C., Perez-Gomez, M. V., Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., . . . Ortiz, A. (2012). Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(suppl 4), iv6-iv10. doi:10.1093/ndt/gfs426
- Jovanovich, A., et al. (2013). Fibroblast Growth Factor 23, Left Ventricular Mass, and Left Ventricular Hypertrophy in Community-Dwelling Older Adults. *Atherosclerosis* 231(1): 10.1016/j.atherosclerosis.2013.1009.1002.
- Kovesdy, C. P. (2014). "Do FGF23 levels change over time and if yes, what do such changes mean?" *Nephrology Dialysis Transplantation* 29(1): 12-14.
- Krajisnik, T., Björklund, P., Marsell, R., Ljunggren, Ö., Åkerström, G., Jonsson, K. B., . . . Larsson, T. E. (2007). Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *Journal of Endocrinology*, 195(1), 125-131. doi:10.1677/joe-07-0267
- Lanske, B., & Razzaque, M. S. (2014). Molecular interactions of FGF23 and PTH in phosphate regulation. *Kidney International*, 86(6), 1072-1074. doi:http://dx.doi.org/10.1038/ki.2014.316
- Larsson, T., Nisbeth, U., Ljunggren, O., Juppner, H., & Jonsson, K. B. (2003). 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*, 64(6), 2272-2279. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00328.x>
- Lavi-Moshayoff, V., Wasserman, G., Meir, T., Silver, J., & Naveh-Many, T. (2010). 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*, 299(4), F882-F889. Retrieved from

<http://ajprenal.physiology.org/content/299/4/F882.abstract>

- Levey, A. S., & Stevens, L. A. (2010). Estimating GFR Using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Creatinine Equation: More Accurate GFR Estimates, Lower CKD Prevalence Estimates, and Better Risk Predictions. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 55(4), 622-627. doi:10.1053/j.ajkd.2010.02.337
- Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H., Zhang, Y., Castro, I. I. I. A. F., Feldman, H. I., . . . Coresh, J. (2009). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of Internal Medicine*, 150(9), 604-612. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006
- Li, Y. C., et al. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(2): 229-238.
- Liu, S., et al. (2006). Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(5): 1305-1315.
- Mace, M. L., Gravesen, E., Hofman-Bang, J., Olgaard, K., & Lewin, E. (2015). Key role of the kidney in the regulation of fibroblast growth factor 23. *Kidney International*. 88(6) doi:10.1038/ki.2015.231
- Meir, T., Durchlacher, K., Pan, Z., Amir, G., Richards, WG., Silver, J., Naveh-Many, T. (2014). Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney International* 86(6): 1106-1115.
- Mendoza, J. M., Isakova, T., Ricardo, A. C., Xie, H., Navaneethan, S. D., Anderson, A. H., . . . Cohort, f. t. C. R. I. (2012). Fibroblast Growth Factor 23 and Inflammation in CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. doi:10.2215/cjn.13281211
- Nilsson, I.-L., et al. (2016). FGF23, metabolic risk factors, and blood pressure in patients with primary hyperparathyroidism undergoing parathyroid adenectomy. *Surgery* 159(1): 211-217.
- Olauson, H., Lindberg, K., Amin, R., Sato, T., Jia, T., Goetz, R., . . . Larsson, T. E. (2013). Parathyroid-Specific Deletion of Klotho Unravels a Novel Calcineurin-Dependent FGF23 Signaling Pathway That Regulates PTH Secretion. *PLoS Genet*, 9(12), e1003975. doi:10.1371/journal.pgen.1003975
- Perwad, F., Azam, N., Zhang, M. Y. H., Yamashita, T., Tenenhouse, H. S., & Portale, A. A. (2005). Dietary and Serum Phosphorus Regulate Fibroblast Growth Factor 23 Expression and 1,25-Dihydroxyvitamin D Metabolism in Mice. *Endocrinology*, 146(12), 5358-5364. doi:10.1210/en.2005-0777

- Riminucci, M., Collins, M. T., Fedarko, N. S., Cherman, N., Corsi, A., White, K. E., . . . Gehron Robey, (2003) P. (2003). FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(5), 683-692. doi:10.1172/JCI18399
- Scanni, R., vonRotz, M., Jehle, S., Hulter, H. N., & Krapf, R. (2014). The Human Response to Acute Enteral and Parenteral Phosphate Loads. *Journal of the American Society of Nephrology*. doi:10.1681/asn.2013101076
- Scialla, J. J., Xie, H., Rahman, M., Anderson, A. H., Isakova, T., Ojo, A., . . . Investigators, t. C. R. I. C. S. (2013). Fibroblast Growth Factor-23 and Cardiovascular Events in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. doi:10.1681/asn.2013050465
- Silver, J., & Naveh-Many, T. (2010). FGF23 and the parathyroid glands. *Pediatric Nephrology*, 25(11), 2241-2245. doi:10.1007/s00467-010-1565-3
- Speer, T., et al. (2015). A single preoperative FGF23 measurement is a strong predictor of outcome in patients undergoing elective cardiac surgery: a prospective observational study. *Critical Care*, 19(1): 190.
- Titan, S. M., Zatz, R., Gracioli, F. G., dos Reis, L. M., Barros, R. T., Jorgetti, V., & Moysés, R. M. A. (2011). FGF-23 as a Predictor of Renal Outcome in Diabetic Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(2), 241-247. doi:10.2215/cjn.04250510
- Wendt, C. (2019, Februar 11). Fallstricke bei der Berechnung. Pharmazeutische Zeitung. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/fallstricke-bei-der-berechnung/>
- Yamashita, T., Yoshioka, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 494-498. doi:http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3696
- Yan, X., Yokote, H., Jing, X., Yao, L., Sawada, T., Zhang, Y., . . . Sakaguchi, K. (2005). Fibroblast growth factor 23 reduces expression of type IIa Na⁺/Pi co-transporter by signaling through a receptor functionally distinct from the known FGFRs in opossum kidney cells. *Genes to Cells*, 10(5), 489-502. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00853.x
- Yoon, H. E., et al. (2011). Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3): 800-813.
- Zhang, B., Umbach, A. T., Chen, H., Yan, J., Fakhri, H., Fajol, A., . . . Lang, F. (2016). Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(2), 384-390. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.034

8. Appendix

8.1. Probencodierung

Um Verwechslungen und damit falsche Ergebnisse zu vermeiden, musste jedes Laborröhrchen vor Testdurchführung entsprechend etikettiert und kodiert werden. Hierfür musste ein platzsparender und verständlicher Code erstellt werden, der auch auf eine größere Gruppe von Probanden, mehr Experimente oder andere Gruppen ausweitbar wäre. Es wurde ein achtstelliger Code verwendet, der sich aus fünf Teilen zusammensetzt. Am Anfang markiert ein großes „T“ die Testgruppe. Weitere Gruppen wären dadurch parallel führbar, zum Beispiel eine **K**ontrollgruppe, gekennzeichnet durch ein großes „K“.

Das folgende erste Zahlendupel bezeichnet die Probandennummer. Zweistellig wäre somit eine Probandenzahl von 99 Personen möglich; eine Erweiterung in den dreistelligen Bereich stellt allerdings auch keine große Schwierigkeit dar. Das mittlere Zahlendupel bezeichnet die Nummer des Testverfahrens. Auch hier wären 99 Testverfahren möglich. Letztendlich wurden in dieser Arbeit nur drei unterschiedliche versuchsaufbauten verwendet. Der Code lautete dementsprechend 01 für den Kochsiazbelastungstest, 02 für den Furosemidtest und 04 für den oralen Wasserbelastungstest, entsprechend der Nummerierung der Testverfahren in der Aufzählung auf dem Probandenaufklärungsbogen und des Projektentwurfes.

Die hinteren zwei Ziffern bezeichnen den Abnahmezeitpunkt und reichen von 01 bis 04. Auch hier wäre eine Erweiterung der Messung bis zu 99 Abnahmen problemlos möglich. Zuletzt bezeichnet ein Buchstabe am Ende, ob es sich um eine **S**erum-, oder eine **P**lasma- oder eine **U**rinprobe handelt.

Ein Beispiel: T010202 P wäre eine Probe des Probanden 1 im Experiment Nummer 2 bei der zweiten Abnahme (zweiter Abnahmezeitpunkt), es handelt sich um eine Plasmaprobe. T030104 S wäre demnach die Serumprobe des Probanden 3 bei Experiment 1 und der vierten Abnahme. Da die Plasmaproben noch in drei Portionen aliquotiert wurden, wurden die einzelnen Proben weiter mit A1 bis A3 (Aliquot 1 bis 3) unterteilt.

8.2. Detaillierter Versuchsablauf, mögliche präanalytische Fehlerquellen sowie Nebenwirkungen im Versuchsverlauf

Im nachfolgenden möchte ich genauer auf die jeweilige Versuchsdurchführung und die verwendeten Materialien ebenso eingehen, wie auf mögliche Störfaktoren und Komplikationen durch die durchgeführten Versuche.

8.2.1. Der Kochsalzbelastungstest

Hierfür wurden handelsübliche Venenverweilkanülen (Vigos), rosa oder grün, in eine geeignete Vene am Unterarm der Versuchsperson, teils mit Hilfestellung des anwesenden Oberarztes, gelegt und mittels Pflaster fixiert.

Es folgte im Anschluss eine zehn minütige Ruhephase in horizontaler Lage, wie vor jeder anderen Blutabnahme. Dann wurde die erste Referenzprobe am kontralateralen Arm abgenommen und im Anschluss die Infusion mit handelsüblicher 1l Kochsalzlösung (0.9% NaCl-Lösung) mittels Standard-Infusionsbesteck über die bereits liegende Venenverweilkanüle begonnen.

In den ersten Versuchsdurchführungen wurde ein spezielles Infusionsbesteck mit eingebautem, mechanisch verstellbarem Tropfenzähler verwendet. Dieser Aufbau wurde aber nach den ersten fünf Probanden eingestellt, da sich durch ein feinfühliges Verstellen eines normalen Infusionsbestecks die Flüssigkeitsabgabe auf die veranschlagte Zeit verlässlicher und einfacher steuern ließ.

Es wurde versucht über die veranschlagten vier Stunden Versuchszeit eine Menge von insgesamt zwei Litern Kochsalzlösung möglichst gleichmäßig zu infundieren, wobei der Beutel vor der dritten Blutentnahme also nach der zweiten Stunde, vollständig infundiert und gegen den zweiten Liter ausgetauscht wurde.

Um eine artifizielle Hämodilution und eine daher entstehende Verunreinigung der Probe möglichst zu vermeiden wurde die Probenentnahme stets am kontralateralen Arm mittels Einmalblutentnahmesystem (Butterfly) durchgeführt.

Die schnelle Verarbeitung der Proben wurde am ehesten durch die Schwierigkeit der Blutgewinnung bei manchen Probanden/innen erschwert. Bei einer maximalen Anzahl von 5 Probanden pro Versuchstag konnte es sein, dass die erste Probe zehn Minuten bei Raumtemperatur gelagert wurde bevor sie mit den anderen abzentrifugiert werden konnte. Diese Verzögerung konnte aber im weiteren Verlauf durch qualifizierteres Arbeiten reduziert werden. Nebenwirkungen in diesem Versuchsaufbau wurden keine verzeichnet.

8.2.2. Der Furosemid Test

Bei diesem Versuch wurde durch intravenöse Applikation von 20 mg Furosemid in einer Kurzinfusion mit 10 ml 0.9% NaCl-Lösung eine forcierte Diurese angestrebt.

Dabei wurde nach der ersten Probenentnahme der Butterfly intravenös liegen gelassen, mittels Pflaster fixiert und die Kurzinfusion über 3-5 Minuten hierüber appliziert.

Folgend wurde nach oben genanntem Schema Blut zu den Kontrollzeitpunkten abgenommen und der ausgeschiedene Urin gesammelt.

In diesem Test wurde versucht den Natriumhaushalt durch intravenöse Applikation von Furosemid zu verändern. Furosemid ist ein potentes Schleifendiuretikum und blockiert einen Na-K-2Cl-Kotransporter in der aufsteigenden Henleschleife des Nephrons. Im klinischen Alltag wird dieses Medikament zum Beispiel zur Therapie eines Lungenödems oder zur Hypertoniebehandlung verwendet.

Der klinische Furosemidtest dient zur näheren Differenzierung eines Hypertonus bzw. zum Ausschluss eines primären Hyperaldosteronismus. Durch seine Wirkung an oben genanntem Kotransporter, hemmt es die Natrium- und Kaliumrückresorption aus dem Harn und führt über vermehrte Salzausscheidung zu gekoppelter Volumenausscheidung. Durch die Natriurese wird im Normalfall beim gesunden Patienten das Renin-Angiotensin-Aldosteron System stimuliert.

Wir verwendeten für den Einsatz bei diesem Versuch die Dosis von 20mg Furosemid.

In diesem Versuchsablauf bot sich als einzige Schwierigkeit nur die zeitgerechte Abnahme der Blutproben und deren Verarbeitungszeit, beeinflusst durch die Zahl der Probanden und deren Venenverhältnisse.

Dieser Versuch war ethisch gesehen der Schwierigste, da gesunden Probanden eine wirksame Menge eines Medikaments mit potentiellen Nebenwirkungen verabreicht wurde. Wir entschieden uns die Dosierung von 40mg Furosemid auf 20 mg zu reduzieren. Außer bei einer Probandin, die während der Versuchsdurchführung über Kopfschmerzen klagte, wurden keine Nebenwirkungen verzeichnet.

8.2.3. Der Wasserbelastungstest

Bei diesem Versuch mussten die Probanden eine vorgegebene Menge von 20ml Leitungswasser pro Kilogramm Körpergewicht innerhalb einer Viertelstunde nach der ersten Blutabnahme zu sich nehmen. Folgend wurde nach dem oben genannten Schema Blut zu den Kontrollzeitpunkten abgenommen und der ausgeschiedene Urin gesammelt. Die Hauptschwierigkeit bei der Durchführung lag hier, neben den schon oben erwähnten Problemen bei der Probengewinnung und Verarbeitung, bei der Fähigkeit der Probanden die erforderliche Menge Flüssigkeit in der vorgeschriebenen Zeit zu sich zu nehmen. Besonders die weiblichen Probandinnen stellte dies teilweise vor eine echte Herausforderung.

Trotzdem wurde die Anforderung von allen Probanden im geforderten zeitlichen Rahmen erfüllt.

Nebenwirkungen traten auch hier keine auf.

Aufgrund zeitlicher Engpässe konnte der Versuch nur an 16 Probanden durchgeführt

werden. Wegen Budgetbeschränkungen wurde bei diesem Versuchsaufbau auf die Bestimmung von ct-proAVP, mr-proANP, sowie PTH verzichtet.

8.3. Probandenaufklärung

Anbei die Kopie der Probandenaufklärung, die jeder Proband vor Versuchsbeginn unterschreiben musste. Auf die hier erwähnten Versuche drei, fünf und sechs haben wir aus Durchführbarkeitsgründen und nach Berücksichtigung des zeitlichen Rahmens der Studie verzichtet.

Probandenaufklärung und Zustimmungserklärung für die Teilnahme an der Studie „Regulation der Serum-FGF23 Spiegel in Abhängigkeit von Volumen- und Natriumhaushalt“

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

FGF-23 ist ein im Knochen produziertes Hormon, welches hilft, den Phosphatspiegel im Blut zu kontrollieren. Es wird durch Phosphataufnahme, Phosphatwerte im Blut, VitaminD und Parathormon, ein Hormon des Knochenstoffwechsels, reguliert und wirkt in der Niere, wo es die Ausscheidung von Phosphat verstärkt. Bei nierenkranken Patienten sind hohe Spiegel von FGF-23 mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle vergesellschaftet. Es scheint auch einen Zusammenhang zwischen FGF-23 und einer krankhaften Verdickung der Herzwand zu geben, wie sie bei hohem Blutdruck oder chronischer Nierenkrankheit gesehen wird. Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht ausreichend erklärt.

Einige experimentelle Befunde legen nahe, dass FGF-23 ein Bindeglied zwischen Knochenstoffwechsel und der hormonellen Regulation von Blutdruck bzw. Salz- und Wasserhaushalt ist. Eine genauere Untersuchung dieses Zusammenhangs könnte zu einem besseren Verständnis der beiden Hormonsysteme führen und die Möglichkeit eröffnen, neue therapeutische Wege bei der Behandlung von Bluthochdruck oder Nierenerkrankungen zu finden.

Hierzu sind Experimente nötig, die die Reaktion von FGF-23 auf verschiedene Tests zeigen, welche zu einer Aktivierung von Hormonen der Blutdruck-, Salz- und Wasserregulation führen. Solche Tests sind schon seit Jahrzehnten bekannt und werden

tächlich in deutschen Kliniken zur Diagnostik hormoneller Erkrankungen unternommen. Diese Tests möchten wir bei Ihnen durchführen und die entsprechenden Hormone sowie FGF-23 bestimmen.

An unserer Studie können Sie teilnehmen, wenn Sie zwischen 18 und 60 Jahre alt und gesund sind. Insbesondere dürfen Sie keine Herz-Kreislaufkrankungen oder Erkrankungen des Knochenstoffwechsels haben und keine Medikamente einnehmen, die Herz-Kreislauf-System oder Knochenstoffwechsel beeinflussen. Auch eine akute Infektion sollten Sie zum Zeitpunkt des Versuchs nicht haben.

Im Rahmen unserer Studie möchten wir mit Ihnen die folgenden Tests durchführen:

1. Kochsalzbelastungstest: Hierbei bekommen Sie 2 l einer handelsüblichen Vollelektrolytlösung über 4 Stunden intravenös verabreicht.
2. Wasserbelastungstest: Hierbei trinken Sie 20 ml pro Kilogramm Körpergewicht Wasser über 15-20 min.
3. Desmopressintest: Es werden 2 Sprühstöße eines Desmopressin(Minirin®)-Nasensprays gegeben. Dieser hebt für kurze Zeit (ca. 4 h) die Fähigkeit der Niere zur Wasserausscheidung auf, d. h. es wird ein sehr konzentrierter Urin ausgeschieden und Wasser im Körper zurückgehalten.
4. Furosemidtest: Es werden 40 mg Furosemid intravenös gespritzt. Dieses gebräuchliche Medikament wirkt wassertreibend, so dass Sie in kurzer Zeit mehrfach größere Mengen Urin lassen müssen.

Evtl. werden wir zwei weitere Tests durchführen:

5. Wasserimmersionstest: 60-minütiges Stehen in 37°C warmem Wasser (bis zum Hals).
6. Durstversuch: Hierbei wird Blut nach 12 Stunden Dursten (übernacht ab 20.00 des Vorabends) abgenommen.

Bei allen Versuchen muß für 8 h vorher auf Koffein und Nikotin verzichtet werden, die Einnahme eines leichten Frühstücks am Morgen vor dem Versuch ist möglich.

Blutentnahmen für die Versuche 1-4 sowie ggf. 5 erfolgen jeweils vor dem Test (also üblicherweise um 8.00), nach 1, 2 und 4 Stunden. Einmalig erfolgt am Beginn der Versuchsreihe eine Bestimmung verschiedener Hormone im Tagesverlauf unter Normalbedingungen durch Blutentnahmen um 8:00, 10:00, 12:00, 16:00. Während der Versuche wird außerdem Urin gesammelt, es erfolgt eine Bestimmung der Urinelektrolyte. Bei den Blutentnahmen werden jeweils etwa 5 ml Blut abgenommen. Dies kann über mehrfache venöse Punktion oder über eine Venenverweilkanüle erfolgen, welche zu Beginn des Versuchs gelegt und nach dem Versuch jeweils entfernt wird. Insgesamt werden Ihnen ca. 100 ml Blut verteilt über mehrere Tage abgenommen. Bis auf etwaige

Blutergüsse oder Schmerzen an der Einstichstelle haben Sie keine negativen Folgen der Blutentnahmen zu fürchten.

Jeder der o.g. Versuche entspricht einem Test, der auch im klinischen Alltag für die Diagnostik von hormonellen Erkrankungen verwendet wird. Für die beiden Medikamente Desmopressin und Furosemid sind Nebenwirkungen in den genannten Dosen bei ansonsten gesunden Personen äußerst selten. Vor allem unspezifische Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Juckreiz oder Übelkeit sind beschrieben, diese bilden sich im Verlauf von selbst zurück. Nach Gabe von Desmopressin könnte durch Wassereinlagerung eine reversible Gewichtszunahme auftreten, es könnte außerdem zeitweilig zu einem Blutdruckanstieg kommen.

Nach Gabe von Lasix kommt es zu vermehrtem Wasserlassen, bei ausgeprägten Wasserverlusten könnte erniedrigter Blutdruck mit in der Folge Kreislaufbeschwerden auftreten, in seltenen Fällen bis hin zu Sehstörungen, Bewusstseinsstörungen, Kollaps etc. Bei zu rascher Injektion kann es zur Auslösung von Hörstörungen oder eines Tinnitus (Ohrgeräusche) kommen.

Es besteht weiterhin ein sehr geringes Risiko einer Überempfindlichkeitsreaktion, wie sie für jedes Medikament auftreten kann, hierzu zählen allergische Reaktion mit z. B. Hautausschlägen, Atemnot oder Herz-Kreislaufbeschwerden, aber auch nichtinfektiöse Entzündungen von Niere oder Bauchspeicheldrüse können sehr selten auftreten.

Elektrolytentgleisungen, v. a. Hyponatriämien und Hypokaliämien, sind für beide Medikamente beschrieben, diese sollten jedoch bei einmaliger Anwendung nicht auftreten und können aufgrund der parallel durchgeführten Elektrolytbestimmungen frühzeitig erkannt und therapiert werden.

Bei den Versuchen 1 und 2 kann es durch die Flüssigkeitsbelastung u. U. zu einem Blutdruckanstieg kommen, welcher sich jedoch nach kurzer Zeit zurückbildet.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten vernichtet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Prof. Dr. med. Michael Fischereider, Dr. med. Matthias Wessely, Dr.

med. Simon Rau. Die Daten werden in einen paßwortgeschützten Rechner eingegeben und für 10 Jahre aufbewahrt.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Ich bin mit der Teilnahme an der Studie und der damit verbundenen Untersuchung von Blut und Urinproben sowie der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

München, den

Unterschrift der Patientin

Unterschrift und Name des
aufklärenden Arztes

Verantwortlicher Leiter der Untersuchung:

Prof. Dr. med. M. Fischereder, Leiter Schwerpunkt Nephrologie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV – Campus Grosshadern, Klinikum der Universität, LMU München, Marchioninstr. 15, 81377 München (Tel. 089 / 7095 – 2211

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Vitamin D- PTH-FGF23-Achse. (Blau, J., & Collins, M., 2015).....	9
Abbildung 2. Übersicht der Möglichkeiten der GFR Berechnung (Wendt, 2019).....	21
Abbildung 3. Übersicht der einzelnen Verläufe der FGF23 Konzentration während des Kochsalzbelastungstests.	24
Abbildung 4. Verlauf der mittleren Reninwerte während der Kochsalzbelastung mit eingezeichneter Trendkurve und Mittelwerten.	25
Abbildung 5. Aufstellung der mittleren Reninwerte als Boxplot zu den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten.	26
Abbildung 6. Kurvenverlauf der mittleren Aldosteronwerte mit Trendkurve und Angabe der Mittelwerte zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten.	27
Abbildung 7. Aufstellung der Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Kochsalzbelastungstests als Boxplot.....	27
Abbildung 8. Übersicht über den FGF23 Verlauf im Boxplot zu den einzelnen Zeitpunkten.....	28
Abbildung 9. Abfall des FGF23 während der Kochsalzbelastung	29
Abbildung 10. Vergleich des gemittelten FGF23 Verlaufs während des Kochsalzbelastungstests im Vergleich zum Verlauf des gemittelten Gesamtproteins....	30
Abbildung 11. Verlauf der mittleren Natriumkonzentration während des Kochsalzbelastungstests.	30
Abbildung 12. GFR zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten als Boxplot.....	31
Abbildung 13. Boxplotgrafik der Messungen des AVP (entspricht AHD) zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest.....	32
Abbildung 14. Boxplotgrafik der Messungen des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest.....	33
Abbildung 15. Boxplotgrafik der Messungen des PTH zum Zeitpunkt 1, vor dem Kochsalzbelastungstest, sowie zum Zeitpunkt 4, nach dem Kochsalzbelastungstest. ...	34
Abbildung 16. Übersicht der einzelnen Verläufe der FGF23 Konzentration während des Furosemidtests.....	35
Abbildung 17. Übersicht über den FGF23 Verlauf im Boxplot zu den einzelnen Zeitpunkten.....	36
Abbildung 18. Vergleich der Verläufe des mittleren FGF23 mit der mittleren Proteinkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests. .	37
Abbildung 19. Boxplot der Kreatininkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten im Furosemidtest.	38
Abbildung 20. Verlauf der Reninwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests.....	38
Abbildung 21. Aufstellung der Reninwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests als Boxplot.....	39
Abbildung 22. Verlauf der mittleren Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests.....	40
Abbildung 23. Aufstellung der Aldosteronwerte zu den Abnahmezeitpunkten während des Furosemidtests als Boxplot.	40
Abbildung 24. Verlauf der mittleren Natriumkonzentration während des Furosemidtests.	41
Abbildung 25. GFR während des Furosemidtests.....	42
Abbildung 26. Boxplot der ANP Werte zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4 zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.....	43
Abbildung 27. Boxplot der AVP Werte zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4	

zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.....	43
Abbildung 28. Einzelverläufe des FGF23 während des oralen Wasserbelastungstests..	45
Abbildung 29. Verlauf der mittleren FGF23 Werte während des oralen Wasserbelastungstests.....	46
Abbildung 30. Boxplot des FGF23 während des oralen Wasserbelastungstests zu den vier Abnahmezeitpunkten.....	46
Abbildung 31. Vergleich der Kurvenverläufe anhand der Mittelwerte zwischen FGF23 und dem Gesamtprotein während des oralen Wasserbelastungstests.....	47
Abbildung 32. Verlauf des mittleren Aldosterons während der oralen Wasserbelastung.....	48
Abbildung 33. Boxplot der Aldosteronkonzentration an den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.....	48
Abbildung 34. Verlauf des mittleren Renins während der oralen Wasserbelastung.....	49
Abbildung 35. Boxplot der Reninkonzentration zu den vier Abnahmezeitpunkten während des oralen Wasserbelastungstests.....	50
Abbildung 36. Verlauf des mittleren Natriums während der oralen Wasserbelastung ...	50
Abbildung 37. Boxplot der Natriumwerte zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.....	51
Abbildung 38. Boxplot des Kreatinins zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.....	52
Abbildung 39. Boxplot der GFR-Werte zu den vier Abnahmezeitpunkten während der oralen Wasserbelastung.....	53
Abbildung 40. Vergleich der Verlaufskurven von FGF23 und Aldosteron im Kochsalzbelastungstest.....	55
Abbildung 41. Vergleich der Verlaufskurven von FGF23 und Renin im Kochsalzbelastungstest.....	56
Abbildung 42. Vergleich der Verläufe von FGF23 und Aldosteron während des Furosemidtests.....	56
Abbildung 43. Vergleich der Verläufe von FGF23 und Renin während des Furosemidtests.....	57
Abbildung 44. Verläufe für FGF23 und Aldosteron während des Wasserbelastungstests.....	57
Abbildung 45. Verläufe für FGF23 und Renin während des Wasserbelastungstests.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Korrelation von FGF23 mit den Baseline- Serum- sowie Urinphosphatkonzentration über alle Versuchsaufbauten	23
Tabelle 2. Mittelwertvergleich vor Versuchsbeginn (Vor NaCl, Zeitpunkt 1) und nach Versuchsende (Nach NaCl, Zeitpunkt 4), mit den dazugehörigen p-Werten im Kochsalzbelastungstest.....	25
Tabelle 3. Renin ($\mu\text{U/ml}$) während des Kochsalzbelastungstests.....	26
Tabelle 4. Aldosteron (pg/ml) während des Kochsalzbelastungstests.....	27
Tabelle 5. FGF23 während des Kochsalzbelastungstests	29
Tabelle 6. Natrium während des Kochsalzbelastungstests	30
Tabelle 7. GFR während des Kochsalzbelastungstests.....	31
Tabelle 8. AVP (pmol/L) während des Kochsalzbelastungstests.....	33
Tabelle 9. ANP (pmol/L) während des Kochsalzbelastungstests	33
Tabelle 10. PTH (pg/ml) während des Kochsalzbelastungstests.....	34
Tabelle 11. Korrelation zwischen FGF23 und den angeführten Parametern im Kochsalzbelastungstest.....	35
Tabelle 12. FGF 23 (RU/ml) während des Furosemidtests	36
Tabelle 13. Kreatinin während des Furosemidtests	37
Tabelle 14. Das Mittlere Renin ($\mu\text{U/ml}$) im Versuchsverlauf des Furosemidtests zu den vier Abnahmezeitpunkten	39
Tabelle 15. Das Mittlere Aldosteron (pg/ml) im Versuchsverlauf des Furosemidtests. .	40
Tabelle 16. Mittlere Natriumkonzentration im Verlauf des Furosemidtests.....	41
Tabelle 17. GFR ($\text{ml/min}/173\text{m}^2$) während des Furosemidtests.....	42
Tabelle 18. ANP (pmol/L) während des Furosemidtests	43
Tabelle 19. AVP (pmol/L) zum Zeitpunkt 1 (Basiswerte) und Zeitpunkt 4 zum Versuchsabschluss nach 4 Stunden.....	44
Tabelle 20. PTH (pg/ml) im Furosemidtest.....	44
Tabelle 21. Korrelationen nach Pearson zwischen FGF23 und den angeführten Parametern im Furosemidtest	44
Tabelle 22. Änderung ausgewählter Parameter im oralen Wasserbelastungstest.....	45
Tabelle 23. Übersicht über FGF23 (RU/ml) während des oralen Wasserbelastungstests.....	47
Tabelle 24. Aldosteron (pg/ml) während der oralen Wasserbelastung	49
Tabelle 25. Renin während des Trinkversuchs	50
Tabelle 26. Übersicht über die Natriumwerte (mmol/L) während der oralen Wasserbelastung	51
Tabelle 27. Übersicht über die Kreatininwerte (8mg/dl) während der oralen Wasserbelastung	52
Tabelle 28. Übersicht über die GFR im oralen Wasserbelastungstest.....	53
Tabelle 29. Pearson Korrelation zwischen FGF23 und den angegebenen Parametern während der oralen Wasserbelastung.....	54
Tabelle 30. Pearson Korrelation zwischen FGF23 und den aufgeführten Parametern, berechnet über alle Versuche.....	54
Tabelle 31. Korrelation nach Pearson zwischen FGF23 und der GFR in den drei einzelnen Versuchsaufbauten.....	55
Tabelle 32. Korrelation zwischen FGF23 und Aldosteron über alle gemessenen Werte	58
Tabelle 33. Korrelation zwischen FGF23 und Renin über alle gemessenen Werte.....	59

Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

München 27.30.2022

Ort, Datum

Thomas Tröger

Unterschrift Doktorand

Lebenslauf

Danksagung

Ich danke allen Probandinnen und Probanden, die sich für die Versuche freiwillig zur Verfügung gestellt haben.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Fischereider also Doktorvater für seine Führung und auch Geduld mit mir und dieser Arbeit danken.

Ein riesiges Dankeschön gebührt meiner Freundin, Marina Talitha Mergen ohne die diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig geworden wäre.