

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
Diabetologie, Endokrinologie, Nephrologie

**Assoziation der Eryptose mit der Anämie bei Patienten mit  
nicht-dialysepflichtiger chronischer Nierenkrankheit**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Schaefer, Lina

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Althaus

Tag der Disputation: 25.09.2025

Meiner Familie gewidmet

Anmerkung: Wenn bei bestimmten Begriffen, die sich auf Personengruppen beziehen, nur die männliche Form gewählt wurde, so ist dies nicht geschlechtsspezifisch gemeint, sondern geschah aus Gründen der besseren Lesbarkeit.

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
III.	TABELLENVERZEICHNIS.....	V
IV.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
V.	FORMELZEICHEN UND EINHEITEN .....	X
1.	EINLEITUNG .....	1
1.1	Chronische Nierenkrankheit .....	1
1.1.1	<i>Definition, Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie</i> .....	1
1.1.2	<i>Stadieneinteilung</i> .....	4
1.2	Anämie und renale Anämie .....	6
1.2.1	<i>Pathophysiologie der renalen Anämie und Eisenmangel</i> .....	6
1.2.2	<i>Therapie der renalen Anämie</i> .....	10
1.3	Eryptose .....	12
1.3.1	<i>Pathogenese der Eryptose</i> .....	13
1.4	Zielsetzung der Studie.....	17
2.	METHODEN .....	19
2.1	Überblick .....	19
2.2	Studienpopulation und laborchemische Messungen .....	19
2.3	Erythrozytenaufreinigung für die durchflusszytometrischen Messungen.....	20
2.4	Inkubation von Kontroll-Erythrozyten in Plasma von Patienten und Kontrollpersonen .....	20
2.5	Durchflusszytometrie (FACS) .....	21
2.5.1	<i>Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS)</i> .....	21
2.5.2	<i>Material</i> .....	22
2.5.3	<i>Eryptose-Messung mittels Bestimmung der Annexin V-Bindung</i> ..	23
2.5.4	<i>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Bestimmung der Erythrozyten</i> .....	24
2.5.5	<i>Bestimmung der Retikulozytenzahl</i> .....	25
2.5.6	<i>Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress</i> .....	25
2.5.7	<i>Ceramid-Bestimmung der Erythrozyten</i> .....	26
2.5.8	<i>FACS-Analyse der 24 h in Plasma inkubierten Erythrozyten</i> .....	27
2.6	Bestimmungen der Laborparameter aus Plasma und Spontanurin	28
2.7	Statistische Analyse.....	28
2.7.1	<i>Verwendete Software</i> .....	29
2.7.2	<i>Datenaufbereitung</i> .....	29
2.7.3	<i>Methodisches Vorgehen</i> .....	34
2.7.4	<i>Inferenzstatistik</i> .....	36
2.7.5	<i>Folgeuntersuchung der Korrelation zwischen Eryptoserate und der Veränderung von Hb-Konzentration und eGFR</i> .....	38

2.8	Materialliste .....	39
2.8.1	<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	39
2.8.2	<i>FACS-Antikörper und Proteine</i> .....	40
2.8.3	<i>Geräte</i> .....	40
2.8.4	<i>Lösungen</i> .....	42
2.8.5	<i>Materialien</i> .....	43
2.8.6	<i>Software</i> .....	44
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
3.1	Charakteristika der Studienteilnehmer .....	46
3.2	Nierenfunktion von Patienten und Kontrollgruppe und Ätiologie der Nierenkrankheit .....	50
3.3	Anämieparameter und Untersuchung auf univariate Korrelation mit der eGFR .....	55
3.4	Bestimmung der Retikulozytenzahl und der Erythropoetin-Konzentration .....	59
3.5	Untersuchung der Eryptoserate, univariate Korrelation mit eGFR und Hb-Konzentration .....	61
3.5.1	<i>Eisenstatus und univariate Korrelation mit GFR, Hb und Eryptoserate</i> .....	65
3.6	Univariate Korrelationen der eGFR, der Hb-Konzentration und der Eryptoserate mit demographischen, klinischen und laborchemischen Parametern .....	68
3.7	Calcium-, ROS- und Ceramid-Bestimmung der Erythrozyten .....	72
3.8	FACS-Parameter der im Plasma inkubierten Kontroll- Erythrozyten .....	73
3.9	Aufstellen eines Vorhersagemodells für die Eryptoserate .....	74
3.10	Folgeuntersuchung der univariaten Korrelation zwischen der Eryptoserate und der Veränderung der Hb-Konzentration und der eGFR ..	75
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>79</b>
4.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Eryptoserate .....	79
4.2	Nierenfunktion, Anämie und Eryptose .....	82
4.3	Anämie bei chronischer Nierenkrankheit .....	85
4.4	Anämie bei CKD: Therapeutische Interventionsmöglichkeiten .....	89
4.5	Diskussion des Studienaufbaus .....	93
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>96</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>XI</b>
<b>VII.</b>	<b>ANHANG: AUFKLÄRUNGSTEXT UND EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG</b> .....	<b>XXV</b>
<b>VIII.</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</b> .....	<b>XXIX</b>
<b>IX.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....	<b>XXX</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>XXXI</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Mechanismen der Eryptose bei CKD-Patienten .....	15
Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Anämie-Entstehung bei CKD.....	17
Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers vom Typ FACS Calibur von BD Biosciences .....	22
Abb. 4: Repräsentative Histogramme der Verteilung der Annexin V-bindenden Erythrozyten .....	24
Abb. 5: Prinzip der Antikörpermarkierung für die Durchflusszytometrie.....	27
Abb. 6: Verteilung der Patienten auf die CKD-Stadien .....	51
Abb. 7: Verteilung der CKD-Patienten auf die Albuminurie-Stadien .....	52
Abb. 8: Verteilung der Patienten nach Ätiologie ihrer chronischen Nierenkrankheit .....	53
Abb. 9: Gruppenvergleiche der Hämoglobin-Konzentration .....	56
Abb. 10: Anämie nach CKD-Stadium und univariate Korrelation zwischen Hämoglobin-Konzentration und eGFR .....	57
Abb. 11: Gruppenvergleich der Hämatokrit-Konzentration .....	58
Abb. 12: Gruppenvergleiche der Retikulozytenzahl.....	60
Abb. 13: Gruppenvergleich der Erythropoetin-Konzentration im Plasma .....	61
Abb. 14: Gruppenvergleiche der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen) ...	62
Abb. 15: Univariate Korrelationen der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen) mit A: eGFR (n = 255) und B: Hb (n = 247) .....	64
Abb. 16: Eisenmangel und Eisenmangelanämie nach CKD- und Albuminurie-Stadium .....	65
Abb. 17: Gruppenvergleich der Eryptoserate der für 24 h im Plasma der Kontrollpersonen und Patienten inkubierten Kontroll-Erythrozyten .....	73

---

Abb. 18: Schematische Darstellung der univariaten Korrelationen zwischen Eryptoserate, eGFR und Hb .....	85
--	----

### III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der CKD in CKD-Stadien (KDIGO, 2013).....	4
Tab. 2: Einteilung der CKD in Albuminurie-Stadien (KDIGO, 2013).....	5
Tab. 3: Korrekturfaktoren A, B und C für die CKD-EPI Kreatinin Formel (Kreatinin in mg/dl) .....	31
Tab. 4: Korrekturfaktoren A, B, C und D für die CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel (Kreatinin in mg/dl und Cystatin C in mg/l) .....	31
Tabelle 5: Reifezeit für die Berechnung des Retikulozytenproduktionsindex (Dufour, 1997) .....	32
Tab. 6: Skalenniveaus der untersuchten Variablen in der Gesamt-, der Patienten- und der Kontrollkohorte und der Kohorte der Folgeuntersuchung ..	33
Tab. 7: Verwendete statistische Verfahren bei unabhängigen und abhängigen Stichproben für unterschiedliche Skalenniveaus .....	35
Tab. 8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien ...	39
Tab. 9: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete FACS-Antikörper und Proteine ..	40
Tab. 10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte .....	40
Tab. 11: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lösungen .....	42
Tab. 12: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien .....	43
Tab. 13: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software .....	44
Tab. 14: Demographische und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer .....	46
Tab. 15: Laborchemische Ergebnisse der Studienteilnehmer aus Vollblut (VB), Plasma (P) und Spontanurin (SU) .....	47
Tab. 16: Arzneimitteleinnahme der Studienteilnehmer .....	49
Tab. 17: Verteilung der Patienten auf CKD- und Albuminurie-Stadien und Prognose der CKD (CKD-Risikokategorien).....	54

---

Tab. 18: eGFR, Hämoglobin-Konzentration und Eryptoserate nach CKD- und Albuminurie-Stadium .....	63
Tab. 19: Eisenstatus-Parameter nach dem CKD-Stadium.....	66
Tab. 20: Univariate Korrelation des Eisenstatus mit der eGFR, dem Hb-Konzentration und der Eryptoserate bei der Gesamtkohorte und den CKD-Patienten .....	67
Tab. 21: Univariate Korrelationen von eGFR, Hb und Eryptoserate mit nominalen Variablen bei den CKD-Patienten .....	68
Tab. 22: Univariate Korrelationen von eGFR, Hb und Eryptoserate mit demographischen und klinischen Variablen und Laborparametern aus Vollblut (VB), Plasma (P) und Spontanurin (SU) in der Gesamtkohorte und bei den CKD-Patienten .....	70
Tab. 23: Univariate Korrelationen von Calcium, ROS und Ceramid mit der eGFR, der Hb-Konzentration und der Eryptoserate bei den CKD-Patienten ....	72
Tab. 24: Modell "schrittweises Anpassen" für die Eryptoserate, Kriteriumsvariable dekadischer Logarithmus der Eryptoserate, Annexin V-bindende Zellen in % ( $r^2 = 0,22$ , $p < 0,001$ , $n = 246$ ).....	74
Tab. 25: Parameter der Kohorte der Folgeuntersuchung zum Messzeitpunkt und bei der Wiedervorstellung.....	76
Tab. 26: Gruppenvergleiche der demographischen und laborchemischen Parameter der Subgruppen der Folgeuntersuchung .....	77

## IV. Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (engl.: Angiotensin Converting Enzyme)
ACR	Albumin-Kreatinin-Quotient (engl.: Albumin-to-creatinine ratio)
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit (engl.: autosomal dominant polycystic kidney disease)
AK	Antikoagulantien
AKI	akute Nierenfunktionseinschränkung (engl.: Acute Kidney Injury)
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AT	Angiotensin
AWB	Annexin-Waschpuffer
BMI	Körpermasseindex (engl.: Body-Mass-Index)
BSA	Bovines Serumalbumin
CKD	chronische Nierenkrankheit (engl.: chronic kidney disease)
CKD-EPI	engl.: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Cys	Cystatin C
DALY	verlorene gesunde Lebensjahre (engl.: disability adjusted life years)
DMSO	Dimethylsulfoxid
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (engl.: estimated glomerular filtration rate)
engl.	englisch
EPO	Erythropoetin
ESA	Erythropoese-stimulierende Substanzen (engl.: Erythropoiesis-Stimulating Agents)
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (engl.: forward scatter)
geoMFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: geometric mean fluorescence intensity)

---

GFR.....	glomeruläre Filtrationsrate
H <sub>2</sub> DCFDA .....	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
Hb.....	Hämoglobin
HIF .....	Hypoxie-induzierter Faktor
HIF-PHI .....	Hypoxie-induzierter Faktor-Prolylhydroxylase-Inhibitor
Hkt.....	Hämatokrit
i.v.....	intravenös
Ig .....	Immunglobulin
IQR.....	Interquartilsbereich (engl.: interquartile range)
JAK3.....	Januskinase 3
k .....	Kontrollen
KCl .....	Kaliumchlorid
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
Krea.....	Kreatinin
lat. ....	lateinisch
LDH .....	Laktatdehydrogenase
m .....	männlich
M .....	Mittelwert
MCDK.....	multizystische Nierendysplasie (engl.: multicystic dysplastic kidney)
MCGN .....	Minimal Change Glomerulonephritis
MCH.....	mittleres korpuskuläres Hämoglobin (engl.: mean corpuscular hemoglobin)
MCHC .....	mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (engl.: mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV .....	mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (engl.: mean corpuscular volume)
Md .....	Median
MDRD .....	engl.: Modification of Diet in Renal Disease Study
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O .....	Magnesiumsulfat Heptahydrat
MPGN .....	Membranoproliferative Glomerulonephritis
NaCl .....	Natriumchlorid
NaOH .....	Natriumhydroxid
NKF KDOQI.....	engl.: National Kidney Foundation Kidney Disease Outcome Quality Initiative

---

P	Plasma
p.o.	peroral (lat.: per os)
PAF	plättchenaktivierender Faktor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PKC	Proteinkinase C
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PS	Phosphatidylserin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl.: relative centrifugal force)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RPGN	engl.: rapidly progressive glomerulonephritis
RPI	Retikulozytenproduktionsindex
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
SD	Standardabweichung
β-Blocker	Betablocker
SSC	Seitwärtsstreuung (engl.: side scatter)
SU	Spontanurin
Tf	Transferrin
TfS	Transferrin-Sättigung
VB	Vollblut
VIF	Varianz-Inflations-Faktor
w	weiblich

## V. Formelzeichen und Einheiten

V	Volumen	Dimensionssymbol
C	Konzentration	Dimensionssymbol
kg	Kilogramm	SI-Basiseinheit des Gewichts
g	Gramm	SI-Einheit des Gewichts, $1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg}$
mg	Milligramm	SI-Einheit des Gewichts, $1 \text{ g} = 10^{-6} \text{ kg}$
ng	Nanogramm	SI-Einheit des Gewichts, $1 \text{ g} = 10^{-9} \text{ kg}$
pg	Pikogramm	SI-Einheit des Gewichts, $1 \text{ g} = 10^{-15} \text{ kg}$
mmol	Millimol	SI-Einheit der Stoffmenge, Basiseinheit ist mol, $1 \text{ mmol} = 10^{-3} \text{ mol}$
s	Sekunde	SI-Basiseinheit der Zeit
h	Stunde	SI-Einheit der Zeit, $1 \text{ h} = 3600 \text{ s}$
min	Minute	SI-Einheit der Zeit, $1 \text{ min} = 60 \text{ s}$
m	Meter	SI-Basiseinheit der Länge
m <sup>2</sup>	Quadratmeter	Einheit der Fläche
m <sup>3</sup>	Kubikmeter	Einheit des Volumens
l	Liter	Volumeneinheit, $1 \text{ l} = 0,001 \text{ m}^3$
dl	Deziliter	Volumeneinheit, $1 \text{ dl} = 10^{-1} \text{ l}$
ml	Milliliter	Volumeneinheit, $1 \text{ ml} = 10^{-3} \text{ l}$
μl	Mikroliter	Volumeneinheit, $1 \text{ μl} = 10^{-6} \text{ l}$
fl	Femtoliter	Volumeneinheit, $1 \text{ fl} = 10^{-15} \text{ l}$
°C	Grad Celsius	Einheit der Temperatur
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro min	Einheit der Geschwindigkeit einer Zentrifuge
rcf	relative centrifugal force, relative Zentrifugal- beschleunigung	Einheit der Kraft einer Zentrifuge als Vielfaches der Erdbeschleunigung
mU	Milli-Unit	Einheit der Enzymaktivität, $1 \text{ mU} = 10^{-3} \text{ U}$ $1 \text{ U} = 1 \text{ μmol Substrat min}^{-1}$
%	Prozent	Mathematische Berechnungsgröße, $1 \% = 0,01$
+	Plus	Mathematisches Formelzeichen
-	Minus	Mathematisches Formelzeichen

---

x	Mal	Mathematisches Formelzeichen
=	Gleich	Mathematisches Formelzeichen
±	Plus / Minus	Mathematisches Formelzeichen
<	Kleiner als	Mathematisches Formelzeichen
>	Größer als	Mathematisches Formelzeichen
≤	Kleiner / Gleich	Mathematisches Formelzeichen
≥	Größer / Gleich	Mathematisches Formelzeichen
log	Logarithmus	Mathematische Berechnungsgröße
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus	Mathematische Berechnungsgröße
Δ	Differenz	Mathematisches Formelzeichen

# 1. Einleitung

Die geschätzte globale Prävalenz der chronischen Nierenkrankheit (engl.: chronic kidney disease, CKD) beträgt über 10 % (Hill et al., 2016, Jha et al., 2013), weshalb die CKD als globales Gesundheitsproblem anerkannt wird (Levey et al., 2007, Eckardt et al., 2013). Auch in Deutschland wird die Zahl der CKD-Patienten auf über 2 Millionen geschätzt (Girndt et al., 2016). Viele der CKD-Patienten leiden unter einer renalen Anämie, welche ihre Leistungsfähigkeit und Lebensqualität erheblich einschränkt (Lefebvre et al., 2006, Portolés et al., 2021) und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität (Astor et al., 2006, Kovesdy et al., 2006, Toft et al., 2020) assoziiert ist. Wichtige Faktoren für die Entstehung dieser Anämie sind die Reduktion der endogenen Erythropoetin- (EPO-) Produktion und ein Eisenmangel (KDIGO et al., 2012, Portolés et al., 2021). Bei Dialysepatienten konnte in mehreren Studien zusätzlich ein vermehrter vorzeitiger Zelltod der Erythrozyten (Eryptose) festgestellt werden (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Dias et al., 2018), der zur Anämie der Patienten beiträgt. Ob die Eryptose auch bei nicht-dialysepflichtigen Patienten vermehrt vorkommt, ist bisher noch nicht bekannt. Kürzlich wurde eine vermehrte Eryptoserate auch in einer Studie bei nicht-dialysepflichtigen Patienten beschrieben (Gok et al., 2022). Im Rahmen der vorliegenden Querschnittstudie sollte genauer untersucht werden, ob auch bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten eine Korrelation zwischen der Eryptose und der Nierenfunktion sowie der Anämie besteht.

## 1.1 Chronische Nierenkrankheit

### 1.1.1 Definition, Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie

Aufgrund steigender Inzidenz und Prävalenz von Nierenkrankheiten, den damit einhergehenden hohen Kosten für das Gesundheitssystem und schlechten Therapieergebnissen, wurde im Jahr 2002 durch die ‚National Kidney Foundation Kidney Disease Outcome Quality Initiative‘ (NKF KDOQI) erstmalig eine einheitliche Definition und Klassifikation der chronischen Nierenkrankheit konzeptualisiert (National Kidney Foundation, 2002). Diese Definition wurde durch die ‚Kidney Disease Improving Global Outcomes‘ (KDIGO) überarbeitet. Unter einer chronischen Nierenkrankheit wird demzufolge eine abnormale Nierenstruktur

oder Nierenfunktion verstanden, die seit mehr als drei Monaten besteht und sich auf die Gesundheit der Patienten auswirkt (KDIGO, 2013). Die Definition umfasst eine Reduktion der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (engl.: estimated glomerular filtration rate, eGFR) auf  $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  oder Zeichen einer Nierenschädigung im Sinne von pathologischen Veränderungen in Serum, Urin, Bildgebung oder Histologie oder einer erfolgten Nierentransplantation (KDIGO, 2013). Dabei ist die Albuminurie der wichtigste Risikofaktor für das kardiale Risiko und eine Progression der chronischen Nierenkrankheit (Herold, 2023).

Die chronische Nierenkrankheit birgt nicht nur ein erhöhtes Risiko für einen fortschreitenden Funktionsverlust der Nieren bis hin zum Nierenversagen mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie, sondern stellt auch einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und andere chronische Erkrankungen dar und geht mit einer erhöhten Hospitalisierungsrate und Mortalität einher (Go et al., 2004, Gansevoort et al., 2013). Die ‚Global Burden of Disease‘-Studie von 2019 stufte die durch die chronische Nierenkrankheit bedingte weltweite Mortalität mit 18,3 Toten auf 100.000 Personen auf Rang 11 ein (vergleichend war die CKD 2010 auf Rang 14 und 1990 auf Rang 19) (Jha et al., 2013). Die CKD war global betrachtet für 41,5 Millionen ‚verlorene gesunde Lebensjahre‘ (engl.: disability adjusted life years, DALY) verantwortlich, was einer Zunahme von 93,2 % im Vergleich zu 1990 entspricht (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020, Ke et al., 2022). Weitere Risiken einer CKD sind eine erhöhte Gefahr für eine akute Nierenfunktionseinschränkung (engl.: Acute Kidney Injury, AKI), eine veränderte Pharmakokinetik von Arzneimitteln, eine erhöhte Infektionsgefahr und ein erhöhtes Risiko für kognitive Beeinträchtigungen und Gebrechlichkeit (KDIGO, 2013).

Die CKD ist mit einer geschätzten globalen Prävalenz von über 10 % (Hill et al., 2016, Jha et al., 2013) eine sehr weit verbreitete Erkrankung. Dabei ist die Prävalenz altersabhängig: In den USA zeigte sich bei über 60-Jährigen eine Prävalenz von über 20 %, bei über 70-Jährigen sogar eine Prävalenz von über 35 % (Eckardt et al., 2013). Auch in Deutschland sind aktuell ca. 80.000 Patienten mit terminalem Nierenversagen in Dialyse-Behandlung und ungefähr 23.000 Patienten befinden sich nach erfolgter Nierentransplantation in Nachsorge (Girndt et al.,

2016). Die Zahl der Patienten mit chronischer Nierenkrankheit in Deutschland wird auf über 2 Millionen geschätzt, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter deutlich steigt. Der Mehrheit der Betroffenen war ihre abnorme Nierenfunktion jedoch nicht bekannt, lediglich 16 % der Betroffenen befanden sich in adäquater medizinischer Behandlung (Girndt et al., 2016). Patienten mit chronischer Nierenkrankheit wiesen außerdem in mehreren Studien eine schlechtere Lebensqualität auf als die untersuchten Kontrollpersonen (Perlman et al., 2005).

In der GCKD- (engl.: German Chronic Kidney Disease) Studie wurden 5217 Patienten mit moderater chronischer Nierenkrankheit (eGFR 30 - 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> oder stark erhöhte Albuminurie / Proteinurie) in Deutschland untersucht, um Ursachen, Komorbiditäten und Therapieergebnisse der CKD genauer zu evaluieren. Die häufigsten zur chronischen Nierenkrankheit führenden Ursachen waren eine vaskuläre hypertensive Nephropathie (23 %), primäre Glomerulonephritis (19 %), diabetische Nephropathie (15 %), Systemerkrankungen (8 %) und interstitielle Nephropathie (4 %). Bei 20 % blieb die Ursache unbekannt, häufig wurde auch eine multifaktorielle Pathogenese vermutet (Titze et al., 2015). Diabetes (35 %) und kardiovaskuläre Erkrankungen (32 %, ohne arterielle Hypertonie) waren häufige Komorbiditäten, Nikotinkonsum (59 % anamnestischer Nikotinabusus) und Fettleibigkeit (43 % mit Körpermasseindex (engl.: Body-Mass-Index, BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>) stellten häufige Risikofaktoren dar (Titze et al., 2015).

Im Rahmen der Progression der CKD und dem damit einhergehenden progressiven Verlust der exokrinen und endokrinen Nierenfunktionen kommt es zu einer stadienabhängig ansteigenden Inzidenz und Prävalenz von Komplikationen der CKD. Darunter versteht man Störungen der Blutdruckregulation (arterielle Hypertonie), Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt (metabolische Azidose), Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels (Vitamin-D-Mangel, Hyperphosphatämie und sekundärer Hyperparathyreoidismus), kardiovaskuläre Komplikationen und hämatologische Komplikationen (renale Anämie, siehe Abschnitt 1.2). Ebenso dazu gezählt werden mit einer gestörten sekretorischen Nierenfunktion einhergehende neurologische und dermatologische Komplikationen und ein Proteinmangel (KDIGO, 2013, Herold, 2023). Die weltweite Inzidenz und Prävalenz von mit CKD assoziierten Erkrankungen, wie Diabetes

mellitus, hypertensive Erkrankungen, metabolisches Syndrom und Adipositas ist ebenso wie die der CKD steigend (Eckardt et al., 2013, GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020), weshalb davon auszugehen ist, dass die Bedeutung der Früherkennung und Behandlung von chronischer Nierenkrankheit und deren Komorbiditäten zukünftig eher zu- als abnehmen wird.

### 1.1.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der chronischen Nierenkrankheit erfolgt anhand von Ätiologie, eGFR (Tab. 1) und Albuminurie (Tab. 2). Die Klärung der Ätiologie der CKD kann dabei mithilfe der Anamnese, klinischen Untersuchungen, Labormessungen, Bildgebung und pathologischen Untersuchungen erfolgen (KDIGO, 2013).

**Tab. 1: Einteilung der CKD in CKD-Stadien (KDIGO, 2013)**

GFR-Stadium	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Beschreibung*
G1	≥ 90	Normal bis erhöht
G2	60 - 89	Leicht vermindert
G3a	45 - 59	Leicht bis mäßig vermindert
G3b	30 - 44	Mäßig bis stark vermindert
G4	15 - 29	Stark vermindert
G5	< 15	Nierenversagen

*Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), GFR (glomeruläre Filtrationsrate)*

*\*im Verhältnis zu jungen Erwachsenen*

*Kategorie G1 und G2 erfüllen bei keinem Nachweis einer Nierenschädigung nicht die Kriterien der CKD.*

Zur Einteilung der Albuminurie-Stadien kann die Albumin-Konzentration im Verhältnis zur Kreatinin-Konzentration verwendet werden (Albumin-Kreatinin-Quotient, engl.: Albumin-to-creatinine ratio, ACR) (siehe Tab. 2) (KDIGO, 2013). Im Rahmen der CKD macht Albumin den größten Anteil der Proteinurie aus und kommt schon bei leichteren Schäden der Glomeruli im Urin vor, bei Tubulopathien finden sich dagegen eher kleinmolekulare Proteine (Herold, 2023). Stadium A3 schließt den nephrotischen Bereich mit ein (ACR > 2200 mg/g Kreatinin) (Herold, 2023).

**Tab. 2: Einteilung der CKD in Albuminurie-Stadien (KDIGO, 2013)**

Albuminurie-Stadium	ACR (mg/g Kreatinin)	Beschreibung*
A1	< 30	Normal bis leicht erhöht
A2	30 - 300	Mäßig erhöht
A3	> 300	Stark erhöht**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), ACR (Albumin-Kreatinin-Quotient)

\* im Verhältnis zu jungen Erwachsenen

\*\*einschließlich des nephrotischen Bereiches (ACR > 2200 mg/g Kreatinin)

Unter einer Progression der CKD versteht man eine Zunahme des CKD-Stadiums begleitet von einer Reduktion der eGFR um mindestens 25 %. Dabei kennzeichnet einen schnellen Progress ein anhaltender Abfall der eGFR um mehr als 5 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> pro Jahr (KDIGO, 2013). Faktoren, die mit einem stärkeren Fortschreiten der CKD assoziiert sind und in die Einschätzung der Prognose miteinbezogen werden sollten, sind die Ursache der CKD, die GFR und Albuminurie, Alter, Geschlecht, Ethnie, erhöhter Blutdruck, Hyperglykämie, Dyslipidämie, Rauchen, Fettleibigkeit, kardiovaskuläre Erkrankungen in der Anamnese und eine fortgesetzte Exposition gegenüber nephrotoxischen Substanzen (KDIGO, 2013). Außerdem kann eine Einteilung in Risikokategorien nach der jeweiligen Prognose für die unterschiedlichen CKD- und Albuminurie-Stadien erfolgen. Dabei gehen eine abnehmende Nierenfunktion und zunehmende Albuminurie mit einer schlechteren Prognose und einer höheren kardiovaskulären und Gesamtmortalität einher (Astor et al., 2011, Gansevoort et al., 2011, KDIGO, 2013).

## 1.2 Anämie und renale Anämie

Eine Anämie ist definiert als Verminderung der Hämoglobin-Konzentration unter die Norm, bei Frauen auf eine Hämoglobin- (Hb-) Konzentration  $< 12,0$  g/dl, bei Männern auf  $< 13,0$  g/dl (KDIGO et al., 2012). Die chronische Nierenkrankheit ist häufig mit einer renalen Anämie vergesellschaftet, welche sich hypoproliferativ und meist normochrom und normozytär darstellt (KDIGO et al., 2012) und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Babitt et al., 2021). Die Anämie schränkt die Leistungsfähigkeit und Lebensqualität der CKD-Patienten erheblich ein (Lefebvre et al., 2006, Finkelstein et al., 2009, Portolés et al., 2021) und ist außerdem mit einem schnelleren Progress der CKD (Portolés et al., 2013), einem höheren Risiko für Nierenversagen (Kovesdy et al., 2006), erhöhter Morbidität und Mortalität (Astor et al., 2006, Kovesdy et al., 2006, Toft et al., 2020), kognitiven Störungen (Dev und Babitt, 2017), höheren Hospitalisierungsraten (Portolés et al., 2013, Toft et al., 2020), höheren Kosten (Nissenson et al., 2005) und mehr schweren kardialen Ereignissen (Toft et al., 2020) assoziiert und stellt einen kardiovaskulären Risikofaktor dar (Iseki und Kohagura, 2007).

Dabei korrelieren Inzidenz, Prävalenz und Ausprägung der renalen Anämie negativ mit der eGFR (KDIGO et al., 2012). In späten Stadien der CKD kommt bei der Mehrheit der Patienten eine Anämie vor (Batchelor et al., 2020).

### 1.2.1 Pathophysiologie der renalen Anämie und Eisenmangel

Die Anämie bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit ist multifaktoriell bedingt (Macdougall et al., 2016). Ein vorrangiger Grund ist die mit dem Verlust der Nierenfunktion einhergehende progressive Reduktion der endogenen EPO-Produktion; weitere beschriebene Faktoren sind unter anderem ein absoluter oder funktioneller Eisenmangel, eine geringere Reaktion des Knochenmarks auf Stimulation durch Erythropoetin aufgrund von urämischen Toxinen und Entzündung, eine reduzierte Lebenszeit der Erythrozyten, ein Vitamin-B12- oder Folsäuremangel, Hypothyreoidismus, Hämolyse, Hyperparathyreoidismus, Malignome und Mangelernährung (Artunc und Risler, 2007, KDIGO et al., 2012, Geddes, 2018, Hayes, 2019, Portolés et al., 2021).

Erythropoetin ist ein hauptsächlich in bestimmten Stromazellen der Niere, den sogenannten Norn-Zellen (Kragesteen et al., 2023), und außerdem in geringer Menge in der Leber produziertes Glykoprotein. Ein niedriger Sauerstoffpartialdruck im Gewebe führt, hauptsächlich durch Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF), zu einer verstärkten Transkription des EPO-Gens. EPO reguliert die Erythropoese, indem es an Rezeptoren an der Oberfläche der erythroiden Vorläuferzellen bindet und als wichtiger Stimulus für Überleben, Proliferation und Differenzierung dient und damit eine bessere Sauerstofftransportfähigkeit des Blutes gewährleistet (Pan et al., 2011, Lang et al., 2012, Portolés et al., 2021). Die EPO-Konzentration der CKD-Patienten ist im Verhältnis zur Ausprägung der Anämie unzureichend erhöht (Babitt und Lin, 2012), der EPO-Mangel beginnt bereits in frühen Stadien der CKD, ist jedoch verstärkt in den CKD-Stadien G4 und G5 vorzufinden (Fehr et al., 2004, Artunc und Risler, 2007). Bei CKD bedingt eine verringerte Durchblutung der Nieren eine geringere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff, eine daraus resultierende Anpassung des Nierengewebes erhält den Gewebesauerstoffgradienten. Dadurch wird allerdings das HIF-System und damit das EPO-Gen nicht aktiviert, es resultiert eine geringere EPO-Produktion (Wenger und Hoogewijs, 2010). Außerdem findet sich bei CKD-Patienten eine geringere Reaktion des Knochenmarks auf Stimulation durch endogenes oder exogenes EPO, was vor allem auf proinflammatorische Zytokine zurückgeführt wird (Geddes, 2018, Portolés et al., 2021). Bei einigen CKD-Patienten werden deshalb bei normalen EPO-Konzentrationen niedrige Hb-Konzentrationen beobachtet (Wagner et al., 2011).

Für eine Stimulation der Erythropoese durch EPO wird außerdem ausreichend Eisen benötigt. Folglich ist ein weiterer häufiger, reversibler Grund für chronische oder progressive Anämie bei CKD eine Eisenmangelanämie, von welcher viele der Patienten betroffen sind (KDIGO et al., 2012). Dabei sind sowohl ein absoluter Eisenmangel als auch ein funktionaler Eisenmangel möglich. Die Serum-Ferritin-Konzentration und die Transferrin-Sättigung (TfS) werden verwendet, um den Eisenstatus einzuschätzen, eine Eisenmangelanämie zu diagnostizieren und eine erythropoetische Reaktion auf eine mögliche Eisentherapie vorherzusagen. Ein Eisenmangel ist definiert als  $TfS \leq 20\%$  und Ferritin-Konzentration

$\leq 100$  ng/ml ( $\leq 10$   $\mu$ g/dl) (KDIGO et al., 2012). Allerdings sind diese Grenzwerte nicht sehr sensitiv für die Eisenmangelanämie bei CKD-Patienten. Eine Studie mit 100 CKD-Patienten (CKD-Stadium G3 bis G5) identifizierte einen Eisenmangel bei nur 17 % der Patienten, während mithilfe des Goldstandards - der Eisenfärbung im Knochenmark – bei 48 % der Patienten ein Eisenmangel diagnostiziert werden konnte (Stancu et al., 2010, Batchelor et al., 2020). Das Plasma-Ferritin ist ein positives Akute-Phase-Protein und wird somit durch Entzündung und außerdem durch Lebererkrankungen beeinflusst (Lipschitz et al., 1974). Es muss deshalb bei CKD-Patienten vorsichtig interpretiert werden. Ferritin-Konzentrationen  $\leq 30$  ng/ml ( $\leq 3$   $\mu$ g/dl) sind stark prädiktiv für leere Eisenspeicher im Knochenmark, Konzentrationen  $> 30$  ng/ml ( $> 3$   $\mu$ g/dl) schließen diese jedoch nicht aus (KDIGO et al., 2012). Transferrin dagegen ist ein negatives Akute-Phase-Protein und häufig bei CKD-Patienten vermindert (Besarab et al., 1999), weshalb das bei einer bestimmten Transferrin-Sättigung an Transferrin gebundene und für die Erythropoese verfügbare Eisen bei CKD niedriger ist und ein Wert  $> 20$  % keinen Eisenmangel ausschließt (Macdougall et al., 2016). Außerdem können diese Parameter nicht sicher zwischen absolutem und funktionalem Eisenmangel unterscheiden (Wish, 2006).

Ein absoluter (oder Speicher-) Eisenmangel ist durch einen aufgebrauchten Gesamteisenspeicher und erniedrigtes im Kreislauf zirkulierendes Eisen mit daraus resultierender eingeschränkter Erythrozyten-Produktion gekennzeichnet (Babitt und Lin, 2012). Er kann durch einen erhöhten Blutverlust, beispielsweise durch Urämie induzierte Thrombozytendysfunktion oder häufige iatrogene Blutentnahmen (Macdougall et al., 2016), eine gestörte Eisenaufnahme, unter anderem aufgrund von Medikamenten wie Phosphatbindern und Antazida, oder durch erhöhte Hcpidin-Level bedingt sein (Zumbrennen-Bullough und Babitt, 2014, Geddes, 2018). Ein funktionaler (oder relativer) Eisenmangel dagegen beschreibt einen Zustand der ineffektiven Verwendung der vorhandenen Eisenspeicher, trotz ausreichender oder sogar erhöhter Eisenspeicher - bei erhöhter Hcpidin-Konzentration, systemischer Inflammation (retikuloendotheliale Blockade) oder relativem Eisenmangel bei exogener EPO-Gabe (Inkongruenz zwischen Angebot und

Nachfrage) (Babitt und Lin, 2012, Macdougall et al., 2016, Batchelor et al., 2020).

Eisen ist ein essenzielles Spurenelement, welches in geringen Mengen über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und anschließend an Transferrin gebunden entweder zu Leber oder Milz transportiert und an Ferritin gebunden gespeichert, oder im Knochenmark zur Erythropoese verwendet wird (Batchelor et al., 2020). Diese Eisenaufnahme über die Nahrung reicht normalerweise zur Kompensation des täglichen Eisenverlustes aus, während die überwiegende Mehrheit der Eisenspeicher durch mithilfe von EPO beeinflusster Phagozytose der seneszenten Erythrozyten durch retikuloendotheliale Makrophagen und Recycling des enthaltenen Eisens wieder aufgefüllt wird (Muckenthaler et al., 2017).

Hepcidin, ein vor allem in der Leber hergestelltes Peptidhormon, reguliert den Eisenmetabolismus zusätzlich, indem es die Eisenaufnahme über den Gastrointestinaltrakt und die Freisetzung aus Eisenspeichern und Makrophagen hemmt (Ganz, 2003, Panwar und Gutiérrez, 2016, Batchelor et al., 2020). Die Produktion von Hepcidin wird bei Zunahme der Eisenaufnahme, Entzündungen oder Infektionen gesteigert, bei Eisenmangel und Hypoxie dagegen gehemmt (Ganz, 2003, Macdougall et al., 2016, Batchelor et al., 2020). Die Ausscheidung von Hepcidin erfolgt über die Niere, mit progressiver Nierenfunktionseinschränkung nimmt diese folglich ab (Babitt und Lin, 2012, Portolés et al., 2021). Bei CKD-Patienten werden erhöhte Hepcidin-Level beobachtet (Zaritsky et al., 2009), die den Eisenmangel folglich verstärken. Diese erhöhten Hepcidin-Level werden auf erhöhte inflammatorische Zytokine, beispielsweise Interleukin-6, geringere renale Ausscheidung und eine erniedrigte EPO-Produktion zurückgeführt (Babitt und Lin, 2012, Zumbrennen-Bullough und Babitt, 2014, Batchelor et al., 2020, Babitt et al., 2021). Ein vorliegender Eisenmangel ist bei CKD-Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Portolés et al., 2021).

Ein weiterer wichtiger, zur Anämie der CKD-Patienten beitragender Faktor ist eine reduzierte Lebenszeit der Erythrozyten, welche durch einen vermehrten vorzeitigen Zelltod (Eryptose) bedingt ist (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Lang et al., 2017, Geddes, 2018, Dias et al., 2020). Darauf wird in Abschnitt 1.3 genauer eingegangen.

### 1.2.2 Therapie der renalen Anämie

Seit der Einführung von rekombinantem, humanem EPO in den späten 1980er-Jahren wurden dieses und ähnliche Erythropoese-stimulierende Substanzen (engl.: Erythropoiesis-Stimulating Agents, ESA) bei CKD als Ersatz für das unzureichende körpereigene EPO eingesetzt, um die Anämie der Patienten zu therapieren. Dadurch verbesserten sich viele der Anämie-bedingten Symptome, außerdem konnten Bluttransfusionen und deren Komplikationen, wie Infektionen, Transplantatabstoßung durch erfolgte Allosensibilisierung oder eine sekundäre Eisenüberladung, reduziert, und so die Lebensqualität der Patienten verbessert werden (Gandra et al., 2010, Johansen et al., 2011, Babitt und Lin, 2012). Trotzdem konnten mit der Anämie assoziierte Risiken (eine erhöhte Mortalität, Hospitalisierung und das Fortschreiten der CKD) nicht vermindert werden (Babitt und Lin, 2012). Zusätzlich zeigte sich, dass die ESA-Therapie mit dem Auftreten von Thrombosen (Lippi et al., 2010), einer erhöhten Mortalität, kardiovaskulären Komplikationen und einer höheren Inzidenz von Schlaganfällen einherging (Babitt und Lin, 2012). Des Weiteren war die ESA-Therapie bei Krebspatienten mit verstärkter Tumorprogression oder Tumorrezidiven und erhöhter Mortalität assoziiert (Bennett et al., 2009, KDIGO et al., 2012). Dabei waren höhere Hb-Zielwerte mit einem größeren Risiko dieser unerwünschten Ereignisse und keiner vergleichweisen Verbesserung der Lebensqualität verbunden (CHOIR-Studie) (Singh et al., 2006). Aus diesem Grund wird eine ESA-Therapie aktuell nur noch bis zu einer Hb-Konzentration von 11,5 g/dl empfohlen und sollte bei Patienten mit aktivem Malignom oder einem Malignom in der rezenten Anamnese nicht eingesetzt werden (KDIGO, 2013). Außerdem wird eine geringe Antwort auf ESAs bei 5 - 10 % der CKD-Patienten mit Anämie beobachtet. Bei dieser Patientengruppe wird trotz hoher ESA-Dosen der Hb-Zielwert nicht erreicht (Ogawa und Nitta, 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass durch Korrigieren eines Eisenmangels erst verzögert und / oder eine geringere exogene EPO- oder ESA-Zufuhr für die Anämiebehandlung bei CKD-Patienten nötig ist (Macdougall et al., 2014). Die Eisentherapie bedingt eine bessere erythropoetische Antwort auf die ESA-Therapie, sie verringert die Ausprägung der Anämie und mit der Anämie zusammenhängende

Symptome und kann Bluttransfusionen vermeiden oder reduzieren (KDIGO et al., 2012). Deshalb wird eine Eisentherapie bei nachgewiesenem Eisenmangel als Initialtherapie empfohlen (KDIGO, 2013). Eine Eisentherapie sollte vermieden werden, wenn damit wahrscheinlich kein klinischer Vorteil erreicht werden kann, um eine mögliche Eisenüberladung und eine möglicherweise damit assoziierte Organdysfunktionen zu vermeiden. Zudem können dadurch therapieassoziierte Nebenwirkungen wie Hypersensitivitätsreaktionen, anaphylaktoide Reaktionen und noch unbekannte Langzeitrisiken umgangen werden (KDIGO et al., 2012, Macdougall et al., 2016). In einer 2018 durchgeführten Metaanalyse konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen intravenöser Hochdosis-Eisentherapie und einem höheren Risiko für Mortalität, Infektionen, kardiovaskulären Ereignissen oder Hospitalisierung bei dialysepflichtigen CKD-Patienten festgestellt werden (Hougen et al., 2018). Die Eisentherapie kann bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten oral oder intravenös erfolgen. Bei Dialyse-Patienten wird eine intravenöse Hochdosis-Eisentherapie empfohlen (KDIGO et al., 2012), da diese im Vergleich zu einer stärkeren Einsparung von ESA-Präparaten und außerdem zu einer Verminderung der kardiovaskulären Ereignisse führt (Herold, 2023).

Eine mögliche neue Medikamentengruppe für die Therapie der Anämie bei CKD-Patienten stellen die Hypoxie-induzierter Faktor-Prolylhydroxylase-Inhibitoren (HIF-PHIs) dar. Sie wirken, indem sie die Aktivität des HIF-Systems unabhängig von Sauerstoff- und Eisen-Leveln steuern und dadurch eine verstärkte endogene EPO-Produktion induzieren, die Eisenverfügbarkeit verbessern und das Hepcidin-Level reduzieren (Babitt et al., 2021).

Trotz der aktuellen Therapieformen der Anämie persistiert diese bei einem Teil der Patienten, andere dagegen leiden an den Nebenwirkungen ihrer Therapie. Darum ist es notwendig, die Mechanismen der Entstehung der Anämie, wie auch den vermehrten vorzeitigen Zelltod der Erythrozyten (Eryptose), genauer zu untersuchen.

### 1.3 Eryptose

Die wichtigste Funktion der Erythrozyten, der Sauerstofftransport, ist essenziell für die Funktion und das Überleben von Geweben und Organen (Lang et al., 2012, Qadri et al., 2017, Dias et al., 2020). Bei Anämie ist diese Funktion beeinträchtigt (Lang et al., 2012). Normalerweise leben Erythrozyten etwa 120 Tage, bevor die seneszenten Erythrozyten aus der Blutbahn entfernt werden (Lang et al., 2012, Qadri et al., 2017, Repsold und Joubert, 2018). Die in einzelnen Studien beschriebene Lebenszeit der Erythrozyten bei Hämodialyse-Patienten war mit  $73,2 \pm 17,8$  (Mittelwert (M)  $\pm$  Standardabweichung (SD)), (Ma et al., 2017)) bis  $89 \pm 28$  Tagen (Sato et al., 2012) stark reduziert, und in einer kürzlich durchgeführten Studie CKD-stadienabhängig vermindert, während sich die EPO-Konzentration in den unterschiedlichen Stadien nicht signifikant unterschied (Li et al., 2019). Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, nimmt die Anämie CKD-stadienabhängig zu (KDIGO et al., 2012). In Modellanalysen wurde bei zunehmend verringerter Erythrozyten-Lebenszeit vermehrt EPO benötigt. Eine kürzere Erythrozyten-Lebenszeit könnte also häufigere und höherdosierte ESA-Gaben voraussetzen. Je nach Ausprägung der Lebenszeit-Verkürzung könnte die ESA-Gabe folglich nicht ausreichend sein, um den Hb-Zielwert bei den Patienten zu erreichen (Dias et al., 2020).

Erythrozyten können, zum Beispiel in Stresssituationen oder bei Zellschäden, bereits frühzeitig einem Prozess unterliegen, welcher dem der Apoptose von kernhaltigen Zellen ähnelt und deshalb auch als Eryptose bezeichnet wird (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Pretorius et al., 2016, Qadri et al., 2017). Bei Patienten mit terminalem Nierenversagen konnte, unabhängig von der zur Anwendung kommenden Dialyse-Form, gezeigt werden, dass die Erythrozyten prozentual vermehrt von diesem vorzeitigen Zelltod (Eryptose) betroffen sind (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Lang et al., 2017, Dias et al., 2018) und anschließend schnell aus dem Blutfluss entfernt werden (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Larsson et al., 2016). Durch die Eryptose kann eine unkontrollierte Hämolyse mit Verlust der Zellintegrität und Freisetzung von intrazellulärem Material, unter anderem intrazellulärem Hämoglobin, vermieden werden (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Qadri et al., 2017), welches sonst durch

Ablagerung in den Nierentubuli zur akuten Nierenfunktionseinschränkung führen könnte (Repsold und Joubert, 2018, Föller und Lang, 2020). Allerdings kann dieser Verlust von Erythrozyten, falls keine ausreichende Kompensation durch eine verstärkte Erythropoese erfolgt, eine Anämie bedingen oder zur renalen Anämie der Patienten beitragen (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015b, Lang et al., 2017).

Außerdem bedingt die Eryptose eine beeinträchtigte Mikrozirkulation und Hyperkoagulabilität durch Adhäsion der eryptotischen Erythrozyten an die Gefäßwand und an Thrombozyten (Borst et al., 2012, Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Qadri et al., 2017, Lang et al., 2017). Damit kann sie möglicherweise kardiovaskuläre Komplikationen, wie plötzlichen Herztod, Myokardinfarkte, periphere Thrombosen und Lungenembolien, begünstigen (Lang et al., 2012, Föller und Lang, 2020).

### **1.3.1 Pathogenese der Eryptose**

Während der Eryptose kommt es typischerweise zu morphologischen Veränderungen der Erythrozyten, unter anderem einer Zellschrumpfung, Membranveränderungen wie einer Bläschenbildung und einer Phosphatidylserin- (PS-) Translokation an die Erythrozyten-Oberfläche (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Pretorius et al., 2016, Repsold und Joubert, 2018). Diese Veränderungen werden durch komplexe Vorgänge ausgelöst, die bisher nicht gänzlich verstanden sind. Die Eryptose kann durch vielfältige endogene und exogene Auslöser bedingt sein, beispielsweise durch Stressoren wie osmotischen Schock, oxidativen Stress, Energieentzug, das Komplementsystem, eine erhöhte extrazelluläre Phosphatkonzentration, Hyperthermie, aber auch durch urämische Toxine wie Indoxylsulfat, oder Xenobiotika (Lang et al., 2006, Abed et al., 2014, Qadri et al., 2017, Lang et al., 2017, Dias et al., 2018, Dias et al., 2020, Gok et al., 2022).

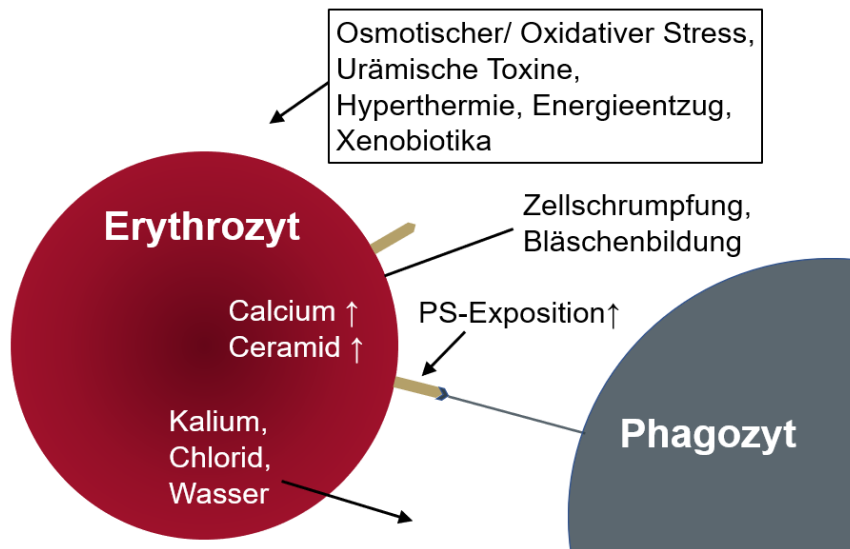
Durch Aktivierung unspezifischer Kationenkanäle, unter anderem durch Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), bei Einwirkung eines der oben genannten Auslöser, kann es zu einem Einstrom von Calcium in die Erythrozyten kommen (Lang und Qadri, 2012, Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Lang et al., 2017). Der intrazelluläre Calciumanstieg bedingt einen Ausstrom von Kalium durch Calcium-sensitive-

Kalium-Kanäle (Gardos-Kanäle), welcher außerdem über eine Hyperpolarisation zu einem Chlorid-Ausstrom führt. Dadurch kommt es anschließend zu einer osmotisch bedingten Zellschrumpfung (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Qadri et al., 2017, Lang et al., 2017, Dias et al., 2020). Zusätzlich aktiviert Calcium Enzyme wie die Protease Calpain, welche einen Abbau des Zytoskeletts der Erythrozyten bedingt und zur Bläschenbildung (engl.: membrane blebbing) führt. Das Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase, Membranstabilität und Zellelastizität (Lang et al., 2006, Pretorius et al., 2016, Qadri et al., 2017, Dias et al., 2020, Li et al., 2022). Am wichtigsten ist die durch den Calciumanstieg verstärkte enzymatische Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Zellmembran durch Aktivierung der Phospholipidtranslokatoren Scramblase und Floppase und Hemmung der Flippase. Dies bewirkt einen Verlust der Membran-Asymmetrie und eine verstärkte Exposition von Phosphatidylserin auf der Erythrozytenoberfläche (Lang et al., 2012, Segawa und Nagata, 2015, Dias et al., 2020, Pretorius et al., 2016).

Des Weiteren wurde eine vermehrte Produktion von Ceramid aus Sphingomyelin durch die Phosphodiesterase Sphingomyelinase im Rahmen der Eryptose beschrieben, was durch die osmotische Zellschrumpfung bei hyperosmotischem Stress über Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) ausgelöst werden könnte (Lang et al., 2012, Lang et al., 2015, Repsold und Joubert, 2018, Gok et al., 2022). Ceramid bedingt wiederum eine verstärkte PS-Exposition (Lang et al., 2010, Lang et al., 2012) und verstärkt die Wirkung von Calcium auf die Erythrozyten (Lang et al., 2015).

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das Bestandteil der Zellmembran ist und sich normalerweise hauptsächlich an der inneren Zellmembran der Lipiddoppelschicht befindet. Nach Translokation an die Erythrozyten-Oberfläche wird es durch Makrophagen (Lang et al., 2012), dendritische Zellen (Larsson et al., 2016) und pro-inflammatorische Monozyten (Bonan et al., 2016) erkannt. Die Erythrozyten werden anschließend phagozytiert und abgebaut (Lang et al., 2012, Pretorius et al., 2016, Arias und Arias, 2017, Dias et al., 2020) und rasch aus der Blutbahn entfernt (Lang et al., 2012). In Abb. 1 ist eine vereinfachte schematische Darstellung der Pathogenese der Eryptose bei CKD-Patienten dargestellt.

Außerdem kann die PS-Exposition durch Adhäsion von Erythrozyten an die Endothelzellen die Mikrozirkulation einschränken (Setty und Betal, 2008). Bei Erythrozyten von Hämodialyse- und Peritonealdialyse-Patienten wurde eine signifikant höhere PS-Exposition beschrieben als bei gesunden Kontrollpersonen (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Dias et al., 2018).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Mechanismen der Eryptose bei CKD-Patienten**

Es wurden bereits vielfältige endogene und exogene Auslöser für die Eryptose, wie osmotischer oder oxidativer Stress, beschrieben. Bei Einwirken dieser Auslöser kann es zu einem intrazellulären Calciumanstieg kommen, welcher über Kalium- und Chlorid-Ausstrom osmotisch eine Zellschrumpfung bedingt. Außerdem kommt es zu einem Abbau des Zytoskeletts mit Bläschenbildung durch Proteasen und einer verstärkten PS-Exposition auf der Erythrozytenoberfläche. Diese PS-Exposition kann durch eine vermehrte Ceramid-Produktion zusätzlich verstärkt werden. Makrophagen und dendritische Zellen erkennen das PS an der Erythrozytenoberfläche, worauf es zur Phagozytose und zum Abbau der Erythrozyten kommt.

Abkürzungen: PS (Phosphatidylserin), CKD (chronische Nierenkrankheit)

Angaben: Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an die Abbildung aus (Dias et al., 2020); für weitere Quellen siehe Absatz 1.3.1.

Ein weiterer wichtiger, die Eryptose verstärkender Faktor ist oxidativer Stress. Dieser ist unter anderem gekennzeichnet durch das überwiegende Vorkommen von Prooxidantien gegenüber protektiven Antioxidantien. Prooxidantien greifen Makromoleküle an und begünstigen eine durch reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) bedingte Störung der Zellkommunikation (Jones, 2006, Dias et al., 2020). Bei CKD ist der oxidative Stress verstärkt (Popolo et al.,

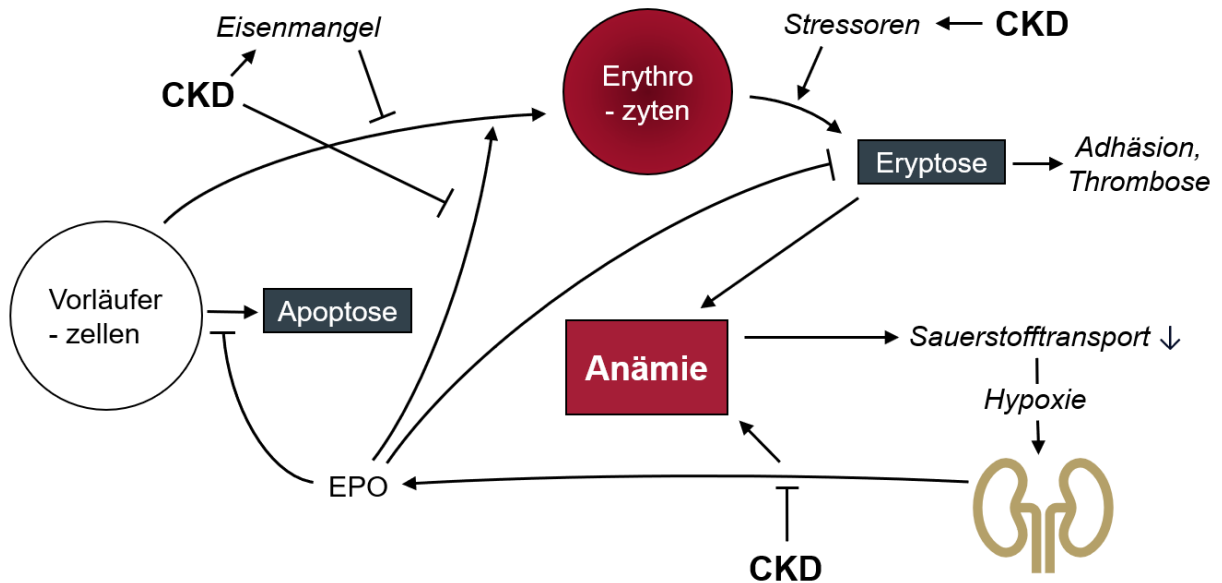
2013) und nimmt mit abnehmender Nierenfunktion zu (Terawaki et al., 2004). Die Entstehung von Prooxidantien bei chronischer Nierenkrankheit ist multifaktoriell bedingt, zum Beispiel durch Inflammation oder Hypoxie. Zusätzlich können wichtige Antioxidantien wie Vitamine bei der Hämodialyse verloren gehen (Rifkind et al., 1991, Bissinger et al., 2019, Dias et al., 2020). Bei CKD-Patienten sind sowohl zu viele ROS vorhanden als auch die enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Kapazität reduziert, was zu einem verstärkten oxidativen Stress, intra- und extrazellulären Schäden und einer damit einhergehenden verstärkten Eryptose führen kann (Ling und Kuo, 2018, Dias et al., 2020, Li et al., 2022). Weiterhin können ROS durch Aktivierung unspezifischer Kationenkanäle die Eryptose bedingen (Lang et al., 2012, Föller und Lang, 2020).

Außerdem kann die Eryptose durch zahlreiche Kinasen, wie beispielsweise die Proteinkinase C (PKC) oder die Januskinase 3 (JAK3), stimuliert werden, während zum Beispiel die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) die Eryptose hemmen kann (Lang et al., 2012, Lang et al., 2017).

Es wird vermutet, dass urämische Plasmabestandteile als Eryptose-Auslöser fungieren könnten, da die PS-Exposition von gesunden Kontrollerythrozyten nach 24-stündiger *in vitro* Inkubation in Patientenplasma signifikant höher war als die von Erythrozyten im Plasma von Kontrollpersonen (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016). Einige, die Eryptose-stimulierende, urämische Toxine, wie Vanadat (Föller et al., 2008) und Acrolein (Ahmed et al., 2013b) wurden bereits identifiziert. Hemmend auf die Eryptose einwirken können dagegen zum Beispiel Stickstoffmonoxid, Katecholamine und Erythropoetin (Föller et al., 2007, Lang et al., 2012, Lang et al., 2017, Repsold und Joubert, 2018).

Die Eryptose scheint somit, neben einer verringerten endogenen EPO-Produktion und Eisenmangel, ein weiterer wichtiger Grund für die Entstehung der renalen Anämie bei dialysepflichtigen CKD-Patienten zu sein.

Die Entstehung der Anämie bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit ist in Abb. 2 schematisch zusammengefasst.



**Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Anämie-Entstehung bei CKD**

Ein vorrangiger Grund für die Entstehung der renalen Anämie ist die verminderte Produktion von Erythropoetin in der Niere. Außerdem findet sich eine durch urämische Toxine und Entzündung bedingte geringere Reaktion der Vorläuferzellen im Knochenmark auf Stimulation durch EPO. Ein durch erhöhte Heparin-Level und vermehrten Verbrauch bei kompensatorisch gesteigerter Erythropoese bedingter Eisenmangel trägt bei vielen der CKD-Patienten zur Anämie bei. Zusätzlich wird eine verminderte Lebenszeit der Erythrozyten beschrieben. Durch vielfältige exogene und endogene Auslöser, wie beispielsweise osmotischen und oxidativen Stress, aber auch urämische Toxine kommt es bei dialysepflichtigen Patienten zu einem vermehrten vorzeitigen Zelltod (Eryptose). Dieser geht mit einer Adhäsion der Erythrozyten an die Gefäßwand und an Thrombozyten und damit einer eingeschränkten Mikrozirkulation und erhöhter Thromboseneigung einher.

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), EPO (Erythropoetin)

Angaben: Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an die Abbildung von (Lang et al., 2017). Für weitere Quellen siehe 1.2.1, 1.3 und 1.3.1.

## 1.4 Zielsetzung der Studie

Bisher gibt es kaum Studien zur Eryptose bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten. Ziel dieser Querschnittstudie war es daher, die Eryptoserate in diesem Kollektiv mittels durchflusszytometrischen Messungen der Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin zu bestimmen und mit der Eryptoserate von Kontrollpersonen zu vergleichen. Anschließend sollten mögliche Zusammenhänge der Eryptoserate mit der Nierenfunktion (eGFR) und der Anämie (Hb) untersucht werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob eine kompensatorische Steigerung der Retikulozytenzahlen und der EPO-Konzentrationen feststellbar sind und ob die

Schwere der Nierenkrankheit mit der Eryptoserate und mit einem möglichen Eisenmangel korreliert. Außerdem war es das Ziel, durch die Beurteilung der Korrelationen der Eryptoserate, der eGFR und der Hb-Konzentration mit demographischen, klinischen und laborchemischen Parametern neue Einsichten zu gewinnen und Hypothesen zu der Eryptose bei chronisch nierenkranken Patienten aufzustellen. Mithilfe einer retrospektiven Wiedervorstellungsuntersuchung sollten die Korrelationen zwischen der Differenz der eGFR und der Hb-Konzentration und der Eryptoserate untersucht werden.

Die Erkenntnisse sollten dazu dienen, die Eryptose als einen der Gründe einer Anämie bei CKD-Patienten besser zu verstehen, um diese zukünftig möglicherweise mit in die Therapieplanung einzubeziehen. Zudem könnte dadurch ein Therapieansatz entwickelt werden, der auf eine Hemmung der Eryptose abzielt, um so die renale Anämie der Patienten und die damit einhergehende schlechtere Prognose besser zu therapieren.

## **2. Methoden**

### **2.1 Überblick**

Basierend auf der Hypothese, dass die Anämie der Patienten mit chronischer Nierenkrankheit nicht nur primär durch einen Erythropoetin- (EPO-) Mangel, sondern auch durch verstärkte Eryptose bedingt ist, wurden im Rahmen einer Querschnittstudie Blutproben von Patienten mit chronischer, nicht-dialysepflichtiger Nierenkrankheit sowie einer Kontrollgruppe untersucht. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde getestet, ob die Erythrozyten der Patienten, im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe, prozentual von einem vermehrten vorzeitigen Zelltod, repräsentiert durch den Anteil der Phosphatidylserin-Exposition, betroffen waren. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Schwere der Nierenkrankheit mit dem Grad der Eryptose und mit einem Eisenmangel korrelierte.

### **2.2 Studienpopulation und laborchemische Messungen**

Für die verwendeten Blut- und Spontanurinproben wurden im Zeitraum von April bis November 2020 Patienten mit chronischer, nicht-dialysepflichtiger Nierenkrankheit aus der nephrologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert. Diese Patienten wurden für die Teilnahme an der Studie aufgeklärt, unterschriebene Einverständniserklärungen liegen vor. Eine Genehmigung der Ethikkommission zur Untersuchung der Eryptose bei Patienten der nephrologischen Ambulanz besteht (Nummer 556/2018BO2). Außerdem wurden Blutproben von gleichgeschlechtlichen und etwa gleichaltrigen Kontrollprobanden aus dem Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen gewonnen, welche ebenfalls ihr schriftliches Einverständnis für die Nutzung ihrer Blutproben im Rahmen von klinischen Studien erteilt hatten. Für die Blutentnahme wurden Lithium-Heparin-Monovetten verwendet. Mithilfe eines CELL-DYN Ruby Hämatologie-Analysesystems (Softwareversion 2.3 ML) und ab dem 27.07.2020 stattdessen mit einem Sysmex KX-21N Hämatologie-Analysator wurde, unmittelbar nach der Blutentnahme, ein Blutbild der Kontrollprobanden bestimmt (Erythrozytenzahl, Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (engl.: mean corpuscular volume, MCV)). Das System wurde gewechselt, um zusätzlich das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (engl.:

mean corpuscular hemoglobin, MCH) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (engl.: mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) der Kontrollpersonen messen zu können. Die relevanten Nierenfunktions- und Anämieparameter der Patienten wurden routinemäßig im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen bestimmt und über das Order-Entry und Statusinformationssystem LAURIS (Swisslab GmbH) nachträglich abgerufen und übernommen. Die Spontanurin-Proben der Patienten wurden bei - 20 °C asserviert. Die asservierten Urinproben wurden zu einem späteren Zeitpunkt zur Nachbestimmung von Gesamt-Eiweiß, Albumin- und Kreatinin-Konzentration im Zentrallabor verwendet (siehe Abschnitt 2.6).

### **2.3 Erythrozytenaufreinigung für die durchflusszytometrischen Messungen**

Zur Aufreinigung der Erythrozyten wurden 500 µl Blut von den Blutproben der Patienten und Kontrollpersonen zu 1,5 ml Ringerlösung (siehe Absatz 2.8.4, Tab. 11) pipettiert, dies wurde mit leichten Schwenkbewegungen durchmischt und auf 2 ml Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml) aufgeschichtet. Anschließend wurde bei 120 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf = engl.: relative centrifugal force) und 20 °C für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Daraufhin wurden erneut 2 ml Ringerlösung hinzugefügt, bei 120 rcf und 20 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Erythrozyten konnten anschließend für die durchflusszytometrischen Messungen verwendet werden.

### **2.4 Inkubation von Kontroll-Erythrozyten in Plasma von Patienten und Kontrollpersonen**

Von den Blutproben wurde das Plasma bei 2500 Umdrehungen pro Minute (rpm = engl.: revolutions per minute, entsprechend 1390 rcf) und 20 °C für 5 Minuten abzentrifugiert, anschließend wurde es abpipettiert, 500 µl davon aliquotiert und das übrige Plasma bei - 20 °C asserviert. Die asservierten Plasmaproben wurden später zur Nachbestimmung von Eisenstatus- und weiteren Laborparametern im Zentrallabor verwendet (siehe Abschnitt 2.6). Zu den aliquotierten 500 µl Plasma von Patienten und Kontrollen wurden 2 µl Erythrozyten einer Kontrollperson mit Blutgruppe 0 hinzu pipettiert und anschließend bei 37 °C für

24 Stunden *in vitro* inkubiert. Diese Erythrozyten wurden anschließend ebenfalls auf ihre Eryptoserate untersucht (siehe Absatz 2.5.8).

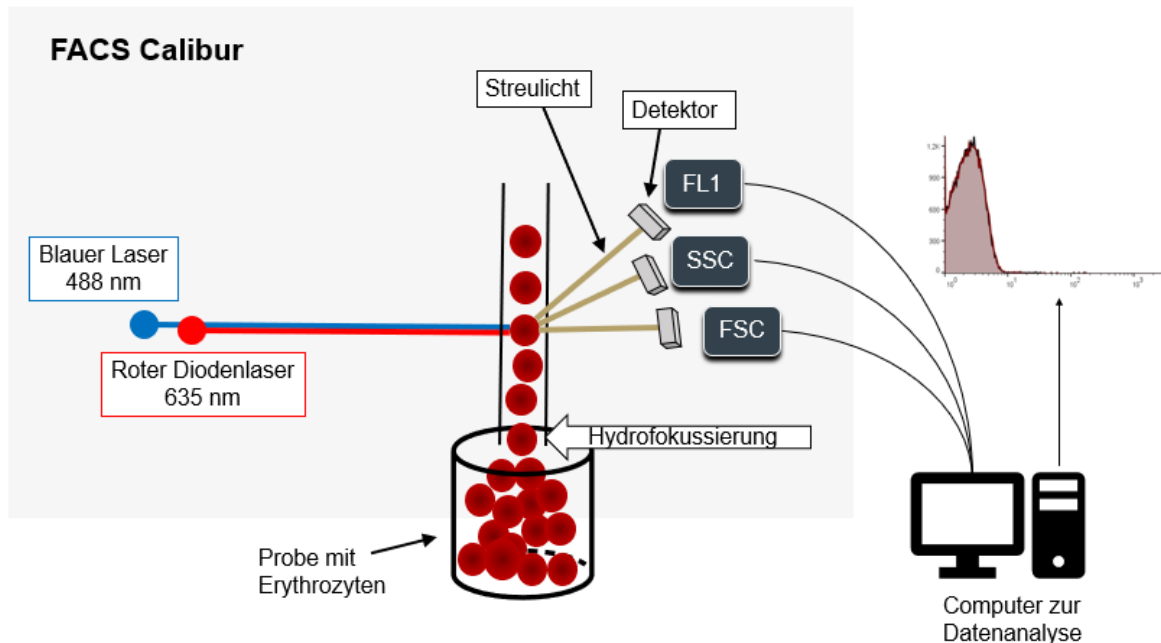
## **2.5 Durchflusszytometrie (FACS)**

### **2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS)**

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse; engl.: fluorescence activated cell sorting) können in sehr kurzer Zeit große Zellzahlen auf verschiedene Charakteristika, wie Größe, Oberflächenstruktur und Granularität, untersucht werden, während diese einen Laserstrahl in der Messzelle des Durchflusszytometers passieren. Für die FACS-Analyse werden die Zellen aus der Probenflüssigkeit in einem Hüllstrom in die Messzelle transportiert und hydrodynamisch fokussiert. Infolgedessen befinden sich nur einzelne Zellen im Laserstrahl. Dabei entsteht Streulicht, welches an verschiedene Detektoren geleitet und dort in elektrische Signale transformiert wird (siehe Abb. 3). Der Detektor der Vorwärtsstreuung (engl.: forward scatter, FSC) erfasst und misst Licht, welches an der Oberfläche der Zelle in kleinen Winkeln abgelenkt wird. Das FSC-Signal ist somit proportional zur Größe der gemessenen Zelle. Die Intensität der Signale am Detektor der Seitwärtsstreuung (engl.: side scatter, SSC) wird hingegen durch in großen Winkeln gestreutes Licht verursacht, und hängt von der Granularität oder internen Komplexität der Zelle ab (McKinnon, 2018). Diese beiden Messwerte können genutzt werden, um einzelne Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden oder Zellen bezüglich ihrer Morphologie zu untersuchen.

Die Durchflusszytometrie kann aber auch dazu verwendet werden, die Oberflächenstruktur und Antigenexposition auf Zellen zu untersuchen. Dabei kommen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte, monoklonale Antikörper zum Einsatz, welche an Oberflächenproteine auf den Zellen binden, und diese anfärben. Während der anschließenden FACS-Analyse wird das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht bestimmter Wellenlängen genutzt, um Rückschlüsse auf die Oberflächenstruktur der Zellen zu ziehen. Teilweise werden auch unmarkierte Antikörper verwendet, welche primär nicht fluoreszenzmarkiert sind. Diese müssen dann anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten, sekundären Antikörper nachgewiesen werden (Im et al., 2019) (siehe Absatz 2.5.7, Abb. 5). Im Rahmen

der nachfolgenden Versuche wurden diese Prinzipien genutzt, um die Charakteristika der aufgereinigten Erythrozyten zu untersuchen.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers vom Typ FACS Calibur von BD Biosciences**

Die Zellen aus der Probenflüssigkeit werden hydrodynamisch fokussiert und passieren anschließend einzeln die Laserstrahlen, das entstehende Streulicht wird mittels Detektoren gemessen (FSC, SSC, FL1) und anschließend zur Analyse der Größe, Oberflächenstruktur und Fluoreszenzintensität genutzt (McKinnon, 2018, BD Biosciences, 2021).

Abkürzungen: FSC (engl.: forward scatter, Vorwärtsstreuung), SSC (engl.: side scatter, Seitwärtsstreuung)

Angaben: Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an die Broschüre zu dem FACS Calibur Durchflusszytometer von (BD Biosciences, 2021).

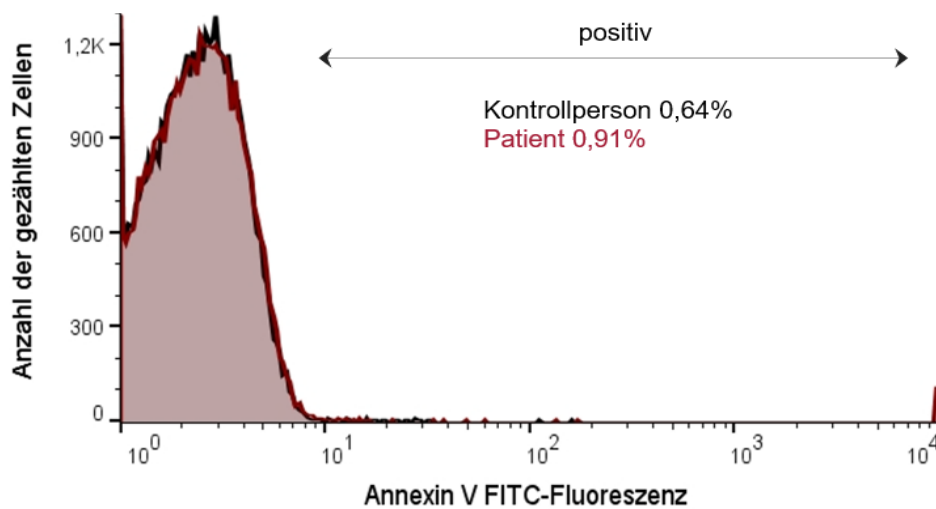
### 2.5.2 Material

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde ein FACS Calibur® FACS-Gerät von BD Biosciences verwendet, welches zwei Laser beinhaltet: einen blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einen roten Diodenlaser mit 635 nm Wellenlänge (siehe Abb. 3) (BD Biosciences, 2021). Für die Aufnahme der FACS-Messdaten, die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensitäten und das Gating wurde die Software BD CellQuest® Pro Version 5.2 (BD Biosciences)

verwendet. Grafisch dargestellt wurden die durchflusszytometrischen Daten mit FlowJo (siehe Absatz 2.8.6).

### **2.5.3 Eryptose-Messung mittels Bestimmung der Annexin V-Bindung**

Die Erythrozyten weisen, während sie sich im Zustand der Eryptose befinden, eine Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche auf. Dieses spielt eine wesentliche Rolle in der Zellkommunikation und der anschließenden Phagozytose der Erythrozyten (Lang et al., 2012, Arias und Arias, 2017). Der Prozentsatz an Phosphatidylserin-positiven Erythrozyten kann demnach als Surrogatmarker für die Eryptose beziehungsweise die verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten angesehen werden (Lang et al., 2006, Lang et al., 2012, Pretorius et al., 2016). Annexin V ist ein intrazelluläres Protein, welches calciumabhängig an Phosphatidylserin bindet (Lang et al., 2012, Mirsaeidi et al., 2016). Mithilfe der Bestimmung der Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin mittels FACS-Analyse konnte die Anzahl der sich in Eryptose befindlichen Erythrozyten bestimmt werden. Dafür wurden zu 500 µl Annexin-Waschpuffer (AWB, siehe Absatz 2.8.4, Tab. 11), welcher 5 mM Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) enthielt, 2 µl der zuvor aufgereinigten Erythrozyten pipettiert. Anschließend wurden 2,5 µl des konjugierten, rekombinanten, Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) gekoppelten Annexin V (Annexin V-FITC, 1:200 Verdünnung, siehe Absatz 0, Tab. 9) hinzugefügt. Nach anschließendem Vortexen wurde das Gemisch bei 37 °C für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde erneut gevortext und die prozentuale Annexin V-Bindung an das sich an der Erythrozytenoberfläche befindliche Phosphatidylserin mittels FACS-Analyse gemessen. Hierfür wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm und eine Emissionswellenlänge von 530 nm verwendet (Bissinger et al., 2016). Um zwischen Annexin V-bindenden Zellen und Kontrollzellen zu unterscheiden, wurde ein Marker (siehe Abb. 4, repräsentiert durch einen Pfeil) herangezogen. Alle Zellen, die sich innerhalb des Markers befanden, wurden als Annexin V-positiv gewertet.



**Abb. 4: Repräsentative Histogramme der Verteilung der Annexin V-bindenden Erythrozyten**

Beispielhafte Analyse der Annexin V-bindenden Zellen von einem Patienten und einer Kontrollperson. Alle Zellen, die sich innerhalb des Markers (hier repräsentiert durch einen Pfeil) befanden, wurden als Annexin V-positive Zellen gewertet.

Angaben: Durchflusszytometrische Messung, Patient (rot) und Kontrollperson (schwarz), Anteil in % der Annexin V-bindenden Erythrozyten (Eryptoserate). Eigene Abbildung, erstellt mit FlowJo und Microsoft PowerPoint. Abbildung veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

#### 2.5.4 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung der Erythrozyten

Mit Calcium-Indikator-Farbstoffen kann Calcium in Zellen nachgewiesen werden. Diese Farbstoffe vollziehen bei Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$  einen Farbwechsel, welcher mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann (McKinnon, 2018). Zur Quantifizierung der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden zu 500  $\mu\text{l}$  AWB 2  $\mu\text{l}$  der aufgereinigten Erythrozyten hinzugefügt. Anschließend wurden 2,5  $\mu\text{l}$  zehnpromzentige Fluo-4 AM Ester Lösung (verdünnt mit Dimethylsulfoxid (DMSO)) hinzu pipettiert. Fluo-4 AM Ester ist die membrandurchgängige Form von Fluo-4, einem Calcium-Indikator-Farbstoff, welche aber selbst kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann. Intrazellulär wird Fluo-4 AM Ester durch Esterasen zu Fluo-4 hydrolysiert, welches bei Calcium-Bindung eine starke Zunahme der Fluoreszenz zeigt (Fisher Scientific, BD Biosciences, 2021). Die Probe wurde anschließend für 30 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt zur Anfärbung für die nachfolgende Messung inkubiert. Anschließend konnte mittels FACS-Analyse bei einer Absorptionswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige

Fluoreszenz (FL-1 Kanal) gemessen (Bissinger et al., 2016) und daraufhin die mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: geometric mean fluorescence intensity, geoMFI) bestimmt werden. Dabei wurde der Wert der Kontrollpersonen als Bezugs- wert normiert und der Wert der CKD-Patienten im Vergleich dazu bestimmt.

### **2.5.5 Bestimmung der Retikulozytenzahl**

Der Prozentanteil der Retikulozyten der Patienten und Kontrollpersonen wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierzu wurden zu 500 µl des BD Reti-Count® Reagenz (siehe Absatz 2.8.1, Tab. 8) 2 µl Erythrozyten hinzu pipettiert und gevortext. Anschließend wurde die Probe bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Vortexen konnte die Probe mittels FACS-Analyse gemessen werden (Bissinger et al., 2016). Ein Gate für die Reti- kulozyten wurde mithilfe der BD Quest® Pro Software (siehe Absatz 2.8.6, Tab. 13) unter Zuhilfenahme der Analyse des Punktediagramms von FSC und SSC gesetzt. Das Setzen eines Gates beschreibt in der Durchflusszytometrie das Ein- zeichnen einer Region um eine Population von Zellen, um diese Zellpopulation anschließend weiter zu untersuchen (McKinnon, 2018). Daraufhin wurde der Pro- zentanteil der Reti-Count-positiven Retikulozyten mittels Thiazol-Orange-Fluo- reszenzintensität im FL-1 Kanal bestimmt.

### **2.5.6 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress**

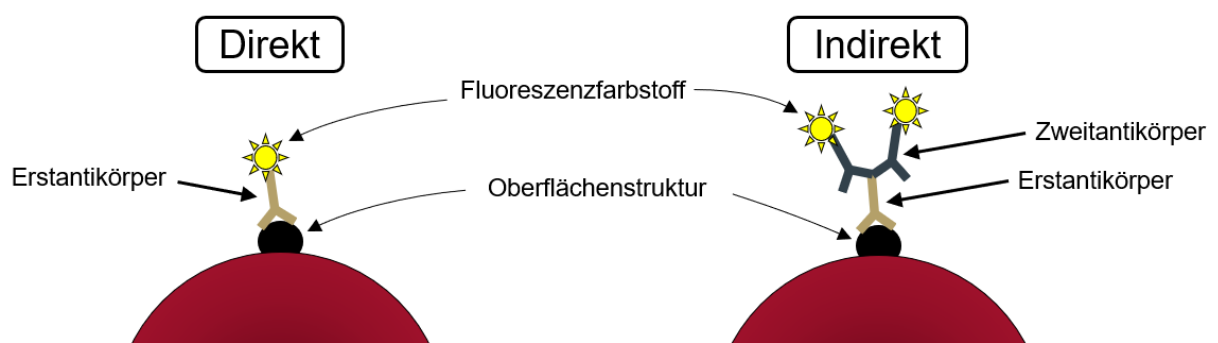
Zellen, die programmierten Zelltod begehen, weisen vermehrt reaktive Sauer- stoffspezies (ROS) und einen damit verbundenen verstärkten oxidativen Stress auf, was eine zentrale Rolle in der Apoptose spielt (Kannan und Jain, 2000). Die- ser oxidative Stress kann mithilfe des Farbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluores- cein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) gemessen werden. Dieses membrangängige, nicht-flu- oreszierende Molekül wird als Indikator für reaktive Sauerstoffspezies in Zellen, in diesem Fall in Erythrozyten, eingesetzt (Chen et al., 2010). Intrazellulär werden die zwei Acetat-Gruppen durch Esterasen abgespalten, anschließend kann H<sub>2</sub>DCFDA oxidiert und in das stark fluoreszierende 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) umgewandelt werden (Chen et al., 2010). Für die Bestimmung der ROS wurden zuerst 4 µl Erythrozyten zu 1 ml Ringerlösung hinzugefügt. Von dieser Zellsus- pension wurden 100 µl auf eine Gewebekulturplatte pipettiert und bei 1600 rpm

(570 rcf) und 20 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 100 µl H<sub>2</sub>DCFDA (verdünnt mit Ringer Lösung, 10 µM) zu jedem Zellpellet hinzu pipettiert. Die Proben wurden bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, dann erneut bei 1600 rpm (570 rcf) und 20 °C für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 100 µl Ringerlösung gewaschen und wieder zentrifugiert (1600 rpm = 570 rcf, 20 °C, 3 Minuten). Anschließend wurden die H<sub>2</sub>DCFDA-beladenen Erythrozyten in 200 µl Ringerlösung resuspendiert (Bissinger et al., 2016). Die ROS-abhängige Fluoreszenz der Proben konnte dann mittels FACS-Analyse gemessen werden (FL-1 Kanal). Als Absorptionswellenlänge wurde 488 nm und als Emissionswellenlänge 530 nm verwendet (Bissinger et al., 2016). Anschließend wurde die geoMFI für die ROS-abhängige Fluoreszenz bestimmt. Dabei wurde ebenfalls der Wert der Kontrollpersonen als Bezugswert normiert und der Wert der CKD-Patienten im Vergleich dazu bestimmt.

### **2.5.7 Ceramid-Bestimmung der Erythrozyten**

Nicht nur intrazelluläres Calcium, sondern auch Ceramid ist ein wichtiger Initiator der Eryptose. Es wirkt Eryptose-fördernd, indem es zu einer vermehrten PS-Exposition führt und die Erythrozyten für Ca<sup>2+</sup> sensitiviert (Lang, 2012) (Föller und Lang, 2020). Um Ceramid an der Erythrozytenoberfläche zu bestimmen, wurde ein auf monoklonalen Antikörpern basierender Assay verwendet. Hierbei wurde ein monoklonaler, unkonjugierter Primärantikörper sekundär mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten, sekundären Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 5). Dafür wurden erneut 4 µl Erythrozyten in 1 ml Ringerlösung suspendiert, davon 100 µl aliquotiert, zentrifugiert (1600 rpm, 20 °C, 3 min) und die Erythrozyten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem verdünnten, monoklonalen Anti-Ceramid-Antikörper (Klon MID15B4, siehe Absatz 2.8.2, Tab. 9) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (1:10 Verdünnung in PBS-BSA (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA), siehe Absatz 2.8.4, Tab. 11)). Nach zwei Waschschritten und zweimaligem Zentrifugieren bei 1600 rpm (570 rcf) und 20 °C für jeweils 3 Minuten wurde ein polyklonaler Zweitantikörper (FITC-gekoppelter Goat Anti-Mouse Immunglobulin G (IgG) und IgM spezifischer Antikörper) zu den Erythrozyten hinzugefügt. Dieser wurde zuvor

1:50 mit PBS-BSA verdünnt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, der ungebundene Zweitantikörper wurde danach mit PBS-BSA herausgewaschen (Bissinger et al., 2016). Die teilweise Antikörper-beladenen Erythrozyten wurden in 200 µl PBS-BSA resuspendiert, anschließend wurden die Proben mittels FACS-Analyse im FL1-Kanal bei einer Absorptionswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen (Bissinger et al., 2016). Die geoMFI wurde für die Ceramid-abhängige Fluoreszenz bestimmt. Hierbei wurde erneut der Wert der Kontrollpersonen als Bezugswert normiert und der Wert der CKD-Patienten im Vergleich dazu bestimmt.



**Abb. 5: Prinzip der Antikörpermarkierung für die Durchflusszytometrie**

Mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten, monoklonalen Antikörpern kann die Oberflächenstruktur und Antigenexposition auf Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden. Bei der direkten Antikörpermarkierung sind die Erstantikörper selbst fluoreszenzmarkiert, bei der indirekten wird ein unmarkierter Erstantikörper verwendet, welcher anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten, sekundären Antikörper nachgewiesen wird (Im et al., 2019). Zur Ceramid-Bestimmung wurde der indirekte Nachweis mittels Erstantikörper (Anti-Mouse) und Zweitantikörper (Goat Anti-Mouse) verwendet, der Zweitantikörper war fluoreszenzmarkiert.

Angaben: Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint.

### 2.5.8 FACS-Analyse der 24 h in Plasma inkubierten Erythrozyten

Nach 24 Stunden wurden die Erythrozyten der Kontrollprobanden (Blutgruppe 0), die am Vortag *in vitro* bei 37 °C in den Plasmaproben von Patienten und Kontrollpersonen inkubiert worden waren (siehe Abschnitt 2.3), weiter untersucht. Hierbei sollte untersucht werden, ob das Plasma der CKD-Patienten Eryptose-auslösende Substanzen enthalten könnte (Bissinger et al., 2024). Dafür wurden jeweils 100 µl in eine Gewebekulturplatte hinein pipettiert und diese anschließend bei 1600 rpm (570 rcf) und 20 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die

Annexin V-Bindung, das intrazelluläre Calcium, ROS und Ceramid bestimmt. Für die Annexin V-Messung wurden 150 µl von Annexin V in AWB verdünnt (1:200 Verdünnung) auf ein Zellpellet pipettiert. Für die Messung des intrazellulären Calciums wurde mit 150 µl von Fluo-4 Lösung (Fluo-4 AM Ester 1:10 verdünnt in DMSO, siehe Absatz 2.8.4) in AWB verdünnt (1:200 Verdünnung) ebenfalls so verfahren. Anschließend wurden die Proben für die Annexin V-Bestimmung für 15 Minuten und für die Fluo-4-Bestimmung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und nachfolgend per FACS-Analyse gemessen. Für die ROS- und Ceramid-Bestimmung wurde analog zu dem zuvor beschriebenen Verfahren (siehe Absatz 2.5.6 und 2.5.7) vorgegangen und erneut mittels FACS-Analyse die geoMFI bestimmt.

## **2.6 Bestimmungen der Laborparameter aus Plasma und Spontanurin**

Für die Nachbestimmung der fehlenden Laborparameter wurden die bei - 20 °C asservierten Plasma- und Urinproben im Wasserbad bei 26 °C aufgetaut, kurz gevortext und anschließend bei 2682 rcf und 20 °C für sieben Minuten zentrifugiert. Danach wurden 800 µl Plasma aliquotiert und zur Nachbestimmung folgender Parameter im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen verwendet: Eisen (in µg/dl), Ferritin (in µg/dl), Transferrin (Tf, in mg/dl), Kreatinin (in mg/dl), C-reaktives Protein (CRP, in mg/dl), EPO-Konzentration (in mU/ml) und Cystatin C (in mg/l). Zudem wurden folgende Parameter aus dem Spontanurin bestimmt: Gesamt-Eiweiß (in g/l), Albumin-Konzentration (in mg/l) und Kreatinin-Konzentration (in mg/dl). Mithilfe dieser Parameter wurden anschließend die Albuminurie (mg/g Kreatinin), Proteinurie (mg/g Kreatinin) und eGFR (mit der CKD-EPI (engl.: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) Kreatinin-Cystatin C und der CKD-EPI Kreatinin Formel, in ml/min/1,73m<sup>2</sup>) berechnet (siehe Absatz 2.7.2).

## **2.7 Statistische Analyse**

Im Rahmen der Querschnittstudie wurden zuerst die Daten für die statistische Analyse aufbereitet und anschließend Methoden aus der deskriptiven Statistik und Inferenzstatistik angewendet. Diese werden in den folgenden Absätzen genauer beschrieben.

### 2.7.1 Verwendete Software

Für die statistische Analyse wurden die R Version 4.0.2 (2020-06-22) (R Core Team, 2020) sowie die RStudio Version 1.3.1093 (RStudio Team, 2020) verwendet. Außerdem wurden die Pakete readxl Version 1.3.1 (Wickham und Bryan, 2019), ggplot2 Version 3.3.5 (Wickham, 2016), jmv Version 2.0 (Selker et al., 2021), dplyr Version 1.0.7 (Wickham et al., 2021), heplots Version 1.3-9 (Fox et al., 2021), tidyr Version 1.1.4 (Wickham, 2021), psych Version 2.1.9 (Revelle, 2021), rstatix Version 0.7.0 (Kassambara, 2021), car Version 3.0-12 (Fox und Weisberg, 2019) und lsr Version 0.5.2 (Navarro, 2015) genutzt.

Die multiple Regressionsanalyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 29.0 (IBM Corp, 2022) und mit MedCalc Version 20.215 (MedCalc Software Ltd, 2023a) durchgeführt. Des Weiteren wurde Microsoft Excel Version 2302 (Microsoft Corporation, 2023a) verwendet (siehe für die verwendete Software auch Absatz 2.8.6, Tab. 13).

### 2.7.2 Datenaufbereitung

Von der Analyse ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Blutentnahmezeitpunkt dialysepflichtig waren, ein akut auf chronisches (engl.: acute on chronic) Nierenversagen oder keine diagnostizierte chronische Nierenkrankheit hatten. Außerdem wurden Patienten ausgeschlossen, die kurz vorher eine intravenöse Eisengabe erhielten. Bei einigen Patienten mit Eisengabe erfolgte eine doppelte Vorstellung und Messung, dabei wurden aber für diese Analyse nur die Daten des nativen oder eisenferneren Termins verwendet. Das Alter der Patienten und Kontrollpersonen wurde in Excel bestimmt, bei unbekanntem Geburtsdatum wurde der 1. Januar zur Berechnung verwendet ( $n = 3$ ). Bei der Messung einzelner Parameter durch das Zentrallabor wurden nicht-numerische Laborwerte angegeben, diese Werte wurden manuell korrigiert. Bei Ferritin ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) wurde bei einer Kontrollperson ein Wert von  $< 0,5 \mu\text{g}/\text{dl}$  angegeben, für die Analyse wurde dieser stattdessen als  $0,4 \mu\text{g}/\text{dl}$  angenommen. Bei der Eiweiß-Konzentration im Spontanurin ( $\text{g}/\text{l}$ ) wurde bei den 45 betroffenen Personen  $0,05 \text{g}/\text{l}$  anstelle von  $< 0,06 \text{g}/\text{l}$  verwendet. Diese Problematik fand sich außerdem bei der Albumin-

Konzentration im Spontanurin wieder, sodass 1 mg/l anstelle von < 2 mg/l ( $n = 4$ ) und 10 mg/l anstelle von < 11 mg/l ( $n = 10$ ) verwendet wurden.

Die Proteinurie und Albuminurie wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Protein-/ Albuminurie (in } \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ Kreatinin)} = \frac{\text{Eiweiß-/ Albumin-Konzentration im Urin in } \frac{\text{mg}}{\text{l}}}{\text{Kreatinin-Konzentration im Urin in } \frac{\text{mg}}{\text{dl}}} \times 100$$

(Kuhlmann et al., 2015).

Die Albuminurie wurde anschließend in die in Tab. 2 (Absatz 1.1.2) aufgeführten Stadien eingeteilt. Der nephrotische Bereich (Albuminurie > 2200 mg/g Kreatinin) wurde dabei in Stadium A3 eingeschlossen (KDIGO, 2013). Eine Anämie wurde als Verminderung der Hämoglobin-Konzentration der Vollblut-Proben unter die Norm, bei Frauen auf Hb < 12,0 g/dl, bei Männern auf < 13,0 g/dl definiert (KDIGO et al., 2012). Für einen Eisenmangel wurden eine TfS  $\leq 20$  % und Ferritin  $\leq 100$  ng/ml ( $\leq 10$   $\mu\text{g/dl}$ ) als Grenzwerte verwendet (KDIGO et al., 2012). Eine Eisenmangelanämie wurde bei Anämie bei zugleich vorliegendem Eisenmangel angenommen. Als Komorbiditäten wurden die Variablen ‚Diabetes‘, ‚arterielle Hypertonie‘ und ‚andere kardiovaskuläre Erkrankungen‘ eingeführt, wobei bei ‚Diabetes‘ sowohl ein diagnostizierter Typ-1-, als auch Typ-2- und Typ-3-Diabetes mellitus eingeschlossen wurden. Als ‚andere kardiovaskuläre Erkrankungen‘ wurden eine diagnostizierte koronare Herzkrankheit (KHK), eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), ein Zustand nach Schlaganfall oder zerebraler Ischämie, Angina pectoris, Atherosklerose, eine hypertensive Herzkrankheit und eine linksventrikuläre Hypertrophie zusammengefasst. Zur Berechnung der eGFR wurde die CKD-EPI Formel verwendet, da diese in Studien genauere Ergebnisse zeigte als die MDRD (engl.: Modification of Diet in Renal Disease Study) Formel. Außerdem wies die Formel einen weniger großen systematischen Fehler (geringerer medianer Unterschied zwischen gemessener und geschätzter GFR) und eine höhere Genauigkeit auf (Levey et al., 2009). Die CKD-EPI Formel kann entweder nur mithilfe des Plasma-Kreatinin-Wertes, des Plasma-Cystatin C-Wertes, oder mit beiden zusammen berechnet werden. Im Vergleich schnitt die kombinierte Formel am besten ab (Inker et al., 2012), weshalb diese nachfolgend verwendet wurde. Es wurde jedoch zum Vergleich auch die eGFR nur mithilfe des Kreatinin-Wertes berechnet.

Folgende Formeln wurden zur Berechnung verwendet (Inker et al., 2012):

$$\text{CKD-EPI Kreatinin: } A \times \left( \frac{\text{Kreatinin} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{B} \right)^C \times 0,993^{\text{Alter}} \times (1,159 \text{ bei schwarzer}$$

Hautfarbe\*), wobei  $A$ ,  $B$  und  $C$  in Tab. 3 dargestellt sind.

**Tab. 3: Korrekturfaktoren  $A$ ,  $B$  und  $C$  für die CKD-EPI Kreatinin Formel (Kreatinin in mg/dl)**

Weiblich		Männlich	
<i>Kreatinin</i> ≤ 0,7	A = 144 B = 0,7 C = - 0,329	<i>Kreatinin</i> ≤ 0,9	A = 141 B = 0,9 C = - 0,411
<i>Kreatinin</i> > 0,7	A = 144 B = 0,7 C = - 1,209	<i>Kreatinin</i> > 0,9	A = 141 B = 0,9 C = - 1,209

$$\text{CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C: } A \times \left( \frac{\text{Kreatinin} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{B} \right)^C \times \left( \frac{\text{Cystatin C} \left( \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right)}{0,8} \right)^D \times 0,995^{\text{Alter}} \times$$

(1,08 bei schwarzer Hautfarbe\*), wobei  $A$ ,  $B$ ,  $C$  und  $D$  in Tab. 4 dargestellt sind.

**Tab. 4: Korrekturfaktoren  $A$ ,  $B$ ,  $C$  und  $D$  für die CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel (Kreatinin in mg/dl und Cystatin C in mg/l)**

Weiblich			Männlich		
	<i>Kreatinin</i> ≤ 0,7	<i>Kreatinin</i> > 0,7		<i>Kreatinin</i> ≤ 0,9	<i>Kreatinin</i> > 0,9
<i>Cystatin C</i> ≤ 0,8	A = 130 B = 0,7 C = - 0,248 D = - 0,375	A = 130 B = 0,7 C = - 0,601 D = - 0,375	<i>Cystatin C</i> ≤ 0,8	A = 135 B = 0,9 C = - 0,207 D = - 0,375	A = 135 B = 0,9 C = - 0,601 D = - 0,375
<i>Cystatin C</i> > 0,8	A = 130 B = 0,7 C = - 0,248 D = - 0,711	A = 130 B = 0,7 C = - 0,601 D = - 0,711	<i>Cystatin C</i> > 0,8	A = 135 B = 0,9 C = - 0,207 D = - 0,711	A = 135 B = 0,9 C = - 0,601 D = - 0,711

Der Korrekturfaktor (\*) wurde in dieser Arbeit nicht angewandt, weil die Hautfarbe der Studienteilnehmer nicht bekannt war. Nach der Berechnung wurden zwei neue Variablen mit den CKD-Stadien der Patienten eingeführt (basierend auf den

zwei CKD-EPI Formeln). Dabei wurden die Stadien nach aktueller KDIGO Definition für die chronische Nierenkrankheit definiert (siehe Absatz 1.1.2, Tab. 1) (KDIGO, 2013). Der Retikulozytenproduktionsindex (RPI), der die Angemessenheit der Erythropoese im Verhältnis zur Anämie ausdrückt, wurde mit der folgenden Formel berechnet (Dufour, 1997): 
$$\frac{\text{Retikulozytenzahl (\%)} \times \frac{\text{Hämatokrit (\%)}}{45}}{\text{Reifezeit im peripheren Blut}}$$
, wobei die verwendeten Reifezeiten in Tabelle 5 dargestellt sind.

**Tabelle 5: Reifezeit für die Berechnung des Retikulozytenproduktionsindex (Dufour, 1997)**

Hämatokrit (%)	Reifezeit im peripheren Blut
≥ 40	1
30 – 39,9	1,5
20 – 29,9	2
< 20	2,5

Dabei zeigt ein RPI von > 3 eine normale Reaktion des Knochenmarks auf eine Anämie, ein RPI < 2 dagegen stellt eine inadäquate Reaktion dar (Dufour, 1997). Für die Analyse der Medikation der Patienten und Kontrollpersonen wurden folgende Arzneimittelgruppen zusammengefasst: Diuretika, Renin-Angiotensin-Aldosteron System- (RAAS-) Hemmer (darunter wurden Angiotensin-konvertierendes Enzym- (engl.: Angiotensin Converting Enzyme, ACE-) Hemmer und Angiotensin- (AT-) 1-Rezeptor-Antagonisten zusammengefasst), Betablocker (β-Blocker), Calciumantagonisten, ‚andere Antihypertensiva‘ (antihypertensive Medikamente, die nicht zu den genannten Kategorien gehörten), Antibiotika (AB), Immunsuppressiva, Antikoagulantien (AK), Protonenpumpeninhibitoren (PPI), Phosphatbinder, Vitamin D, Bikarbonat, Thyroxin, Antidepressiva oder Antipsychotika, Cholesterinsenker, ESA und Eisen (Gesamt und perorale (lat.: per os, p.o.) oder intravenöse (i.v.) Applikation). Wenn bei den Studienteilnehmern eine Arzneimitteleinnahme vorlag, wurde diese mit ‚1‘ notiert, andernfalls mit ‚0‘. Hierbei wurde eine Bedarfsmedikation als ‚0‘ festgelegt, da nicht bekannt war, ob und wie häufig diese eingenommen wurde. Aufgrund der durchschnittlichen Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen, wurde Medikation, die vor weniger als einer Woche abgesetzt oder pausiert wurde, als ‚1‘ definiert. Bei i.v. Eisengabe

wurde eine Anwendung im Zeitraum von einem Jahr vor Blutentnahme als ‚1‘ definiert. Einige der Variablen wurden vor der Analyse auf gängige Nachkommastellen gerundet.

Es wurde für alle untersuchten Variablen das Skalenniveau (nominal-, ordinal-, oder intervallskaliert) bestimmt, wobei bei intervallskalierten Variablen zusätzlich überprüft wurde, ob eine Normalverteilung der Werte vorlag (mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests), oder ob diese durch Logarithmieren mit dem dekadischen Logarithmus erreicht werden konnte (siehe Tab. 6). Verhältnisskalierte Variablen wurden mit unter intervallskaliert zusammengefasst.

Hiernach wurden anschließend die für die jeweiligen Parameter und Gruppenvergleiche geeigneten Methoden der deskriptiven Statistik und Inferenzstatistik ausgewählt (siehe Tab. 7).

**Tab. 6: Skalenniveaus der untersuchten Variablen in der Gesamt-, der Patienten- und der Kontrollkohorte und der Kohorte der Folgeuntersuchung**

Skalenniveau und NV	Gesamt: Variablen mit diesem Skalenniveau	Kontrollen: Variablen mit diesem Skalenniveau	Patienten: Variablen mit diesem Skalenniveau	Folgeuntersuchung: Variablen mit diesem Skalenniveau
<i>nominal</i>	Geschlecht, Ätiologie der Nierenkrankheit, Komorbiditäten, Dauermedikation			
<i>ordinal</i>	CKD-Stadium, Albuminurie-Stadium			
<i>intervallskaliert, NV</i>	MCV, MCHC			
	Hkt, Erythrozyten			
	Hb, Eiweiß, HS			
	MCH, eGFR-CK, eGFR-K	Eisen	MCH, Ceramid, Tf, HbWV	
<i>intervallskaliert, NV nicht gegeben, durch <math>\text{Log}_{10}</math> NV erreicht</i>	Retikulozytenzahl			
	Annexin V	FT-Annexin V		
		BMI, Annexin V, ROS, Ceramid, eGFR-CK, Ferritin		
	Hb, Hkt, FT-Ceramid, Eisen, EPO	FT-ROS, SU-Krea	MCH, Hkt, eGFR-K, Cys-C, Krea, Eisen, TfS, eGFRWV	
<i>intervallskaliert, NV nicht</i>	Alter, Fluo-4, FT-Fluo-4, Tf, TfS, CRP, Proteinurie, Albuminurie, Albumin, LDH			
	Cys-C, Krea			
	ROS, Ceramid, FT-ROS, Ferritin			

<i>gegeben, durch Log<sub>10</sub> NV nicht er- reicht</i>	Hb, MCH, Hkt, Erythrozy- tenzahl, FT-An- nexin V, FT-Cer- amid, eGFR-CK, eGFR-K, Eisen, EPO	Annexin V	MCH, Hkt, FT- Ceramid, eGFR-K, EPO	FT-ROS, FT- Ceramid, EPO, AlterWV, Δ Da- tum
--	---	-----------	--	---

*Abkürzungen: NV (Normalverteilung), GFR (glomeruläre Filtrationsrate), MCV (mittleres Erythrozyteneinzelvolumen), MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration), Hkt (Hämatokrit), Hb (Hämoglobin), HS (Harnsäure), MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin), eGFR-K und eGFR-CK (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate nach CKD-EPI Kreatinin und Kreatinin-Cystatin C Formel), Tf (Transferrin), Log<sub>10</sub> (dekadischer Logarithmus), Annexin V (Annexin V-bindende Zellen), FT (Folgetag, FACS-Parameter der 24h inkubierten Erythrozyten), BMI (Body-Mass-Index), ROS (reaktive Sauerstoffspezies), EPO (Erythropoetin), SU (Spontanurin), Cys-C (Cystatin C), Krea (Kreatinin), TfS (Transferrin-Sättigung), WV (Wiedervorstellung), CRP (C-reaktives Protein), LDH (Laktatdehydrogenase), Δ Datum (Tage zwischen Messung und Wiedervorstellung)*

*Angaben: Intervallskalierten Variablen wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf NV untersucht. Verhältnisskalierte Variablen wurden mit unter intervallskaliert zusammengefasst.*

### 2.7.3 Methodisches Vorgehen

Zur Prüfung von Gruppenunterschieden eines Parameters und zur Testung von Korrelationen der Variablen untereinander, wurden, je nach Skalenniveau (siehe Tab. 6), unterschiedliche Testverfahren für unabhängige und bei der Folgeuntersuchung für abhängige Stichproben verwendet. Eine Aufschlüsselung ist in Tab. 7 aufgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0,05$  festgelegt. In der Darstellung der Ergebnisse werden folgende Symbole verwendet: bei  $p \geq 0,05$  n.s. (nicht signifikant), bei  $p < 0,05$  \*, bei  $p < 0,01$  \*\* und bei  $p < 0,001$  \*\*\*. Bei intervallskalierten, normalverteilten Daten werden die Ergebnisse als Mittelwert (M)  $\pm$  Standardabweichung (SD), bei intervallskalierten, nicht-normalverteilten Daten als Median (Md) (Interquartilsbereich (engl.: interquartile range, IQR)) angegeben, wobei  $n$  die Anzahl der eingeschlossenen Personen repräsentiert.

**Tab. 7: Verwendete statistische Verfahren bei unabhängigen und abhängigen Stichproben für unterschiedliche Skalenniveaus**

Skalenniveaus und NV der Variablen	Statistisches Verfahren	Ergebnisdarstellung
<i>Nominal + nominal oder ordinal</i>	Chi-Quadrat-Test	Kreuztabelle, p-Wert
<i>Kategorial (zwei Gruppen) + intervallskaliert, NV</i>	Zweiseitige t-Tests, Pearson-Korrelationstest	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, p-Wert
<i>Kategorial (zwei Gruppen) + intervallskaliert, nicht-NV</i>	Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon Rangsummentest)	Median (Interquartilsabstand), p-Wert
<i>Nominal (&gt; 2 Ausprägungen) + intervallskaliert, NV oder ordinal (mehr Gruppen) + intervallskaliert, NV</i>	Analysis of covariance (ANOVA), Tukey Post-hoc-Analysen	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, p-Wert
<i>Nominal/ ordinal (mehr Gruppen) + intervallskaliert, nicht-NV</i>	Kruskal-Wallis-Test, paarweise Wilcoxon Post-hoc-Analyse und Bonferroni-Korrektur	Median (Interquartilsabstand), p-Wert
<i>Intervallskaliert + intervallskaliert</i>	Pearson-Korrelationstest	Korrelationskoeffizient (r), p-Wert, grafische Darstellung mit Punktwolke und linearer Anpassung
<i>Intervallskaliert, NV + mehrere mögliche Einflussgrößen</i>	Multiple lineare Regressionsanalyse	Multipler Determinationskoeffizient ( $r^2$ ), korrigiertes $r^2$ , p-Wert des Modells, unabhängige Variablen mit standardisiertem Schätzer, p-Wert

Abkürzungen: NV (normalverteilt)

Angaben: Verhältnisskalierte Variablen wurden mit unter intervallskaliert zusammengefasst.

Patienten und Kontrollpersonen wurden auf Unterschiede hinsichtlich der demographischen Variablen und der klinischen und laborchemischen Parameter untersucht. Gruppen- und Stadienvergleiche weiterer Variablen fanden anhand der

in Tab. 7 aufgeführten Testverfahren statt und wurden anschließend grafisch dargestellt. Eine univariate Regressions- und Korrelationsanalyse der unterschiedlichen intervallskalierten Variablen erfolgte anhand von Streudiagrammen und Korrelationsmatrizen.

#### 2.7.4 Inferenzstatistik

Anhand der in Tab. 7 aufgeführten Testverfahren für unabhängige Stichproben wurden, je nach Skalenniveau, Gruppenvergleiche der unterschiedlichen Variablen durchgeführt und diese auf signifikante Gruppenunterschiede untersucht.

Mithilfe einer multiplen linearen Regressionsanalyse wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate die Beziehung zwischen einer abhängigen Variablen Y (Kriteriumsvariable), in diesem Fall der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen), und verschiedenen unabhängigen Variablen X (Prädiktorvariablen) untersucht.

Damit sollte ein Vorhersagemodell nach folgendem Schema aufgestellt werden:  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + \dots + b_kX_k$ , wobei  $b_0$  eine modellspezifische Konstante und  $b_1$  bis  $b_k$  die Regressionskoeffizienten der ins Modell eingeschlossenen signifikanten Variablen  $X_1$  bis  $X_k$  darstellen (MedCalc Software Ltd, 2023b).

Für die multiple Regressionsanalyse wurde das Geschlecht als binäre Variable kodiert, wobei für weibliche Personen der Wert 0 und für männliche der Wert 1 angenommen wurde. In dem Versuch eine Normalverteilung der Residuen zu erreichen, wurde vor der Analyse die abhängige Variable (intervallskaliert, nicht-normalverteilt) mit dem dekadischen Logarithmus transformiert. Nach dieser Transformation wurde mithilfe einer multiplen Regressionsanalyse das beste Modell der Kriteriumsvariable für die Gesamtkohorte (bestehend aus sowohl Patienten und Kontrollpersonen) aufgestellt. Als Methode für den Variableneinschluss wurde die schrittweise Vorgehensweise (engl.: Stepwise) angewandt. Zum Hinzufügen von Variablen wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  verwendet, zum Entfernen von Variablen ein p-Wert von  $> 0,1$ . Daraus ergaben sich schließlich die Einflussvariablen des Modells, die im Ergebnisteil berichtet werden (siehe Abschnitt 3.9). Dabei wurden folgende Variablen als Prädiktorvariablen (unabhängige Variablen) in die Analyse miteinbezogen: Alter (Jahre), Geschlecht, Hb (g/dl), MCV (fl),

Retikulozytenzahl (%), CRP (mg/dl), EPO (mU/ml), Ferritin ( $\mu\text{g/dl}$ ), Eisen ( $\mu\text{g/dl}$ ), TfS (%), Tf (mg/dl) und die eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel).

Des Weiteren wurde auf mögliche Variablen mit Konfundierungseffekt getestet, dabei wurden die verwendeten Arzneimittelgruppen (siehe Absatz 2.7.2) und die Komorbiditäten (Diabetes, arterielle Hypertonie und ‚andere kardiovaskuläre Erkrankungen‘) untersucht. Um ein ausbalanciertes Design zu erhalten, wurden die Personen, bei denen nicht alle Parameter bekannt waren, von der Multiplen Regression ausgeschlossen.

Anschließend wurden Voraussetzungen der multiplen linearen Regressionsanalyse getestet. Mithilfe von standardisierten Residuen, studentisierten ausgeschlossenen Residuen, Hebelwerten (Huber, 2011) und Cook-Distanzen wurde auf Ausreißer untersucht. Auf Multikollinearität wurde anhand der Toleranz und der Varianz-Inflations-Faktoren (VIF) getestet. Dabei gilt ein VIF-Wert = 1 als nicht korreliert,  $1 < \text{VIF} \leq 5$  als moderat korreliert und  $\text{VIF} > 5$  als starkes Indiz für eine Multikollinearität, Toleranz-Werte von  $< 0,1$  weisen auf eine Multikollinearität hin (Daoud, 2017). Zur Überprüfung der Annahme einer Homoskedastizität wurden einerseits Streudiagramme von studentisierten Residuen und unstandardisierten vorhergesagten Variablen verwendet und außerdem die Analyse gewichtet mit  $\frac{1}{(\text{Standardabweichung (SD)})^2}$  wiederholt (Neter et al., 1996) und die Ergebnisse verglichen. Außerdem wurden die Residuen der Modelle mithilfe von Histogrammen, P-P-Diagrammen und dem Shapiro-Wilk- und dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht.

In der Ergebnisdarstellung wird für die Beschreibung der Güte des Modells der multiple Determinationskoeffizient oder Bestimmtheitsmaß  $r^2$  angegeben (das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten), welcher Ausschluss darüber gibt, wieviel der Varianz der Kriteriumsvariablen durch das Modell erklärt werden kann (Cohen, 1988). Außerdem wurde das korrigierte  $r^2$  verwendet, welches die Anzahl der unabhängigen Variablen miteinbezieht, um den positiven Bias zu korrigieren und genauso wie der multiple Determinationskoeffizient  $r^2$  interpretiert werden kann (Cohen, 1988). Anschließend wurde die Signifikanz des Modells überprüft, das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5 % festgelegt ( $p < 0,05$ ). Der

Einfluss der jeweiligen Variablen wird mithilfe des standardisierten Schätzers (Betafaktor), des p-Werts und des inkrementellen (ansteigenden)  $r^2$  aus jedem Analyseschritt angegeben.

### **2.7.5 Folgeuntersuchung der Korrelation zwischen Eryptoserate und der Veränderung von Hb-Konzentration und eGFR**

Patienten, die sich nach mindestens einem halben Jahr ( $\geq 182$  Tage) und höchstens einem Jahr ( $\leq 365$  Tage) erneut im Universitätsklinikum Tübingen vorstellten, wurden in eine retrospektive Folgeuntersuchung eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten, die vor der Wiedervorstellung dialysepflichtig geworden waren, Hb-relevante Blutungen hatten, Erythrozytenkonzentrate erhielten oder schwanger wurden. Es wurde untersucht, ob die Eryptoserate der Patienten bei der ursprünglichen Messung mit der Veränderung der Hb-Konzentration ( $\Delta$  Hb) und der Veränderung der eGFR ( $\Delta$  eGFR) im Vergleich zur Folgeuntersuchung korrelierte. Für die eGFR wurde die CKD-EPI Kreatinin Formel (siehe Absatz 2.7.2) verwendet, da bei der Wiedervorstellung nicht bei allen Patienten ein Cystatin-C-Wert bestimmt wurde. Mit einer univariaten Korrelationsanalyse wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Retikulozytenzahl und dem  $\Delta$  Hb bestand. Außerdem wurde eruiert, ob die Patienten eine Eisentherapie oder Erythropoese-stimulierende-Substanzen erhielten und ob sich die Patienten mit oder ohne diese Therapien in Bezug auf  $\Delta$  Hb,  $\Delta$  eGFR oder die Eryptoserate signifikant unterschieden. Es wurde zudem eine Subgruppenanalyse der oben genannten Variablen durchgeführt, wobei Subgruppe 1 Patienten umfasste, deren  $\Delta$  Hb  $< 0$  g/dl betrug und Subgruppe 2 Patienten mit  $\Delta$  Hb  $\geq 0$  g/dl. Dabei sollte betrachtet werden, ob die Patienten, deren Hb-Konzentration sich seit der Messung verschlechtert hatte (Subgruppe 1), zum Messzeitpunkt eine höhere Eryptoserate aufwiesen, als diejenigen, deren Hb-Konzentration stabil geblieben war oder sich verbessert hatte (Subgruppe 2). Außerdem sollte überprüft werden, ob sich die  $\Delta$  eGFR der beiden Subgruppen signifikant unterschied.

## 2.8 Materialliste

### 2.8.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien**

<b>Chemikalie</b>	<b>ID</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>Ampuwa</i>	10333435	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, DE
<i>BD Reti Count<sup>®</sup> Reagenz</i>	349204	BD Biosciences	San Jose, USA
<i>Bovines Serumalbumin (BSA)</i>	A9418	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)</i>	CN93.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>DCFDA 2',7'-Dichlorodihydro- fluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA)</i>		Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>D-(+)-Glucose</i>	G7528	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	4720.4	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>Dulbecco's Phos- phatgepufferte Kochsalz- lösung (PBS)</i>	D8537	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Fluo-4 AM Ester</i>	50018	Biotium, Inc.	Fremont, USA
<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-pipera- zinyl-ethansulfonsäure (Hepes)</i>	HN78.2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-pipera- zinyl-ethansulfonsäure (Hepes)</i>	9105.2	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>Kaliumchlorid (KCl)</i>	6781.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>Kaliumchlorid (KCl)</i>	P4504	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Kaliumchloridlösung (pH-Meter)</i>	L3008	SI Analytics GmbH	Mainz, DE
<i>Magnesiumsulfat Heptahyd- rat (MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O)</i>	63138	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Natriumchlorid (NaCl)</i>	S7653	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Natriumhydroxid (NaOH)</i>	1.06469	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

<i>Pancoll human</i>	P04-60100	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, DE
----------------------	-----------	------------------	---------------

### 2.8.2 FACS-Antikörper und Proteine

**Tab. 9: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete FACS-Antikörper und Proteine**

<b>Antikörper/ Protein</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>Klon</b>	<b>ID</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>Annexin V</i>	FITC		3149001 3X2	Immuno-Tools GmbH	Friesoythe, DE
<i>Anti-Ceramid-Antikörper</i>	Monoklonal, Unkonjugiert	MID 15B4	ALX-804-196-T050	Enzo Biochem, Inc.	Farmingdale, USA
<i>Goat Anti-Mouse IgG/IgM</i>	FITC	Polyklonal	555988	BD Biosciences	San Jose, USA

### 2.8.3 Geräte

**Tab. 10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>CO<sub>2</sub>-Inkubator</i>	C150 (E2)	BINDER GmbH	Tuttlingen, DE
<i>Durchflusszytometer (FACS-Gerät)</i>	FACSCalibur	BD Biosciences	San Jose, USA
<i>Hämatologie-Analysator</i>	Sysmex KX-21N	Sysmex Corporation	Kobe, Japan
<i>Hämatologie-Analysesystem</i>	CELL-DYN Ruby (Softwareversion 2.3 ML)	Abbott Laboratories	Abbott Park, USA
<i>Kühlschrank</i>	LabStar Scandilux (LSSC) 4005	National Lab GmbH	Mölln, DE
<i>Pipette 0.1 - 2 µl</i>	Discovery Comfort	Corning Inc. (Corning HTL S.A.)	Corning, USA (Warschau, Polen)
<i>Pipette 0,5 - 10 µl</i>	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE

<i>Pipette 20 - 200 <math>\mu</math>l</i>	Discovery Comfort	Corning Inc. (Corning HTL S.A.)	Corning, USA (Warschau, Po- len)
<i>Pipette 100 - 1000 <math>\mu</math>l</i>	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
<i>Pipette 100 - 1000 <math>\mu</math>l</i>	LABMATE Optima	Abimed GmbH	Langenfeld, DE
<i>Pipettierhilfe</i>	PeqMATE	PEQLAB Biotech- nologie GmbH	Erlangen, DE
<i>pH-Meter</i>	Lab 850	SI Analytics GmbH	Mainz, DE
<i>Schüttelwasserbad</i>	SW20	Julabo Labortech- nik GmbH	Seelbach, DE
<i>Sicherheitswerkbank</i>	HERAsafe HS12	Kendro Labora- tory Products GmbH	Langenselbold, DE
<i>Tiefkühlschrank (- 20 °C)</i>	Öko super	Liebherr-Internati- onal AG	Bulle, CH
<i>Ultratiefkühltruhe (- 80 °C)</i>	Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
<i>Vortexmischer</i>	Reax I	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, DE
<i>Vortexmischer</i>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, USA
<i>Vortexmischer</i>	VX100	Abimed GmbH	Langenfeld, DE
<i>Feinwaage</i>	SI-114A	Denver Instrument	Göttingen, DE
<i>Waage</i>	Kern PLS/PLJ 420-1200	Kern& Sohn GmbH	Balingen, DE
<i>Zentrifuge</i>	Heraeus Me- gafuge 2.0R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
<i>Tischzentrifuge</i>	Rotanta 460 R (5605)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, DE

## 2.8.4 Lösungen

**Tab. 11: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lösungen**

<b>Lösung</b>	<b>ID</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<u>Annexin-Waschpuffer</u> (500 ml) NaCl 3,653 g Hepes 1,192 g CaCl <sub>2</sub> 0,277 g NaOH 0,084 g Ampuwa 494,79 ml		Eigene Herstellung	Tübingen, DE
<u>H<sub>2</sub>DCFDA-Lösung</u> (verdünnt mit DMSO auf 100 mM)		Eigene Herstellung	Tübingen, DE
<u>FACSClean</u>	340345	BD Biosciences	San Jose, USA
<u>FACSFlow Trägerflüssigkeit</u>	342003	BD Biosciences	San Jose, USA
<u>FACSRinse</u>	340346	BD Biosciences	San Jose, USA
<u>Fluo-4-Lösung</u> (Fluo-4 AM Ester 1:10 mit DMSO)		Eigene Herstellung	Tübingen, DE
<u>PBS-BSA</u> BSA 0,05 g PBS 50 ml		Eigene Herstellung	Tübingen, DE
<u>Ringer Lösung</u> (500 ml) NaCl 3,653 g KCl 0,186 g MgSO <sub>4</sub> 0,148 g Hepes 3,837 g Glucose 0,451 CaCl <sub>2</sub> 0,056 NaOH 0,271 Ampuwa 491,4 ml		Eigene Herstellung	Tübingen, DE

### 2.8.5 Materialien

**Tab. 12: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien**

<b>Produkt</b>	<b>ID</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>Descosept AF</i>	00792283	Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld, DE
<i>Descosept sensitive</i>	00-323DS-010	Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld, DE
<i>FACS Falcon 5 ml Rundboden-Polystyrolröhrchen</i>	352008	Corning Inc.	Corning, USA
<i>FACS Falcon 5 ml Rundboden-Polystyrolröhrchen</i>	352052	Corning Inc.	Corning, USA
<i>FACS Falcon 6 mm</i>	799013	Barloworld Scientific Ltd.	UK
<i>FACS Schraubverschluss-Röhrchen, 3.5 ml</i>	62.617	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
<i>FACS Schraubverschluss-Deckel</i>	62.617	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
<i>Gewebekulturplatten Falcon, 96 Wells</i>	353072	Corning Inc.	Corning, USA
<i>Nitril Handschuhe</i>	290418	Abena	Aabenraa, Dänemark
<i>Nitril Handschuhe</i>	942207	Hartmann Gruppe	Heidenheim, DE
<i>Pipettenspitzen 0,1 - 10 µl</i>	P866.1	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, DE
<i>Pipettenspitzen 200 µl</i>	70.760.002	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
<i>Pipettenspitzen 1000 µl</i>	2100610	Ratiolab GmbH	Dreieich, DE
<i>Pipettenspitzen 1000 µl</i>	70.3050	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
<i>Falcon Polypropylen-Röhrchen 15 ml</i>	188271	Greiner Bio One GmbH	Frickenhausen, DE
<i>Falcon Polypropylen-Röhrchen 50 ml</i>	227261	Greiner Bio One GmbH	Frickenhausen, DE

<i>Reaktionsgefäß 1,5 ml</i>	616201	Greiner Bio One GmbH	Frickenhausen, DE
<i>Reaktionsgefäß 2 ml</i>	623201	Greiner Bio One GmbH	Frickenhausen, DE
<i>S-Monovette® Lithium-Heparin, 5,5 ml</i>	03.1628	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, DE
<i>Folienstift</i>	Multimark 1523	Faber-Castell	Stein, DE
<i>Stripette 10 ml, Serologische Pipette</i>	4101	Corning, Inc.	Corning, USA
<i>Vakuumfiltrationssystem Stericup-Quick-Release</i>	S2GPU05RE	Merck KGaA	Darmstadt, DE
<i>Wägebapier</i>	186002	Macherey-Nagel	Düren, DE

### 2.8.6 Software

Für die zur statistischen Analyse verwendete Software siehe auch Absatz 2.7.1.

**Tab. 13: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
<i>BD CellQuest® Pro (Version 5.2) (BD Biosciences)</i>	BD Biosciences	San Jose, USA
<i>EndNote (Version 20.4.1) (The EndNote Team, 2013)</i>	Clarivate Analytics	London, UK
<i>FlowJo® (Version 10.8.1) (BD Life Sciences, 2022)</i>	FlowJo LCC	Ashland, USA
<i>IBM SPSS Statistics (Version 29.0) (IBM Corp, 2022)</i>	International Business Machines Corp. (IBM Corp.)	Armonk, USA
<i>MedCalc (Version 20.215) (MedCalc Software Ltd, 2023a)</i>	MedCalc Software Ltd	Ostend, Belgien
<i>Microsoft Excel (Version 2302) (Microsoft Corporation, 2023a)</i>	Microsoft Corporation	Redmond, USA
<i>Microsoft PowerPoint (Version 2302) (Microsoft Corporation, 2023b)</i>	Microsoft Corporation	Redmond, USA

---

<i>Microsoft Word (Version 2302) (Microsoft Corporation, 2023c)</i>	Microsoft Corporation	Redmond, USA
<i>Order-Entry und Statusinformationssystem LAURIS</i>	Swisslab GmbH	Berlin, DE
<i>R (Version 4.0.2) (R Core Team, 2020)</i>	R Foundation	Wien, Österreich
<i>RStudio (Version 1.3.1093) (RStudio Team, 2020)</i>	RStudio, Inc.	Boston, USA

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakteristika der Studienteilnehmer

Insgesamt wurden Blut- und Urinproben von 153 Patienten untersucht ( $n = 75$  männlich (m),  $n = 78$  weiblich (w)). Ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Blutentnahmezeitpunkt dialysepflichtig waren ( $n = 1$ ), ein akut auf chronisches Nierenversagen aufwiesen ( $n = 2$ ), kurz vor der Messung Eisen i.v. erhielten ( $n = 1$ ) oder keine bestätigte chronische Nierenkrankheit hatten ( $n = 27$ ) (Gesamt:  $n = 31$ ,  $n = 13$  m,  $n = 18$  w). In die Studie eingeschlossen wurden 122 Patienten, welche in der nephrologischen Ambulanz wegen chronischer, nicht-dialysepflichtiger Nierenkrankheit behandelt wurden ( $n = 62$  m,  $n = 60$  w, Alter Md = 58 (IQR = 28) Jahre, siehe Tab. 14). Einen Diabetes mellitus hatten 36 Patienten (30 %, davon  $n = 4$  Typ 1,  $n = 31$  Typ 2 und  $n = 1$  Typ 3),  $n = 84$  hatten eine arterielle Hypertonie (69 %) und  $n = 49$  ‚andere kardiovaskuläre Erkrankungen‘ (40 %, siehe Absatz 2.7.2 für eine Auflistung der hierunter zusammengefassten Erkrankungen). Zudem wurden die Blutproben von 133 Kontrollpersonen aus dem Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin in Tübingen untersucht ( $n = 62$  m,  $n = 71$  w, Alter 55 (28) Jahre, siehe Tab. 14).

**Tab. 14: Demographische und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer**

<b>Charakteristikum</b>	<b>Kontrollgruppe (<math>n = 133</math>)</b>	<b>CKD-Patienten (<math>n = 122</math>)</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Geschlecht</i> <sup>1</sup>	62 m (47 %), 71 w (53 %)	62 m (51 %), 60 w (49 %)	<b>0,5855</b>
<i>Alter (Jahre)</i> <sup>2</sup>	55 (28)	58 (28)	<b>0,0013</b>
<i>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</i> <sup>2</sup>		26,4 (6,9)	
<i>Diabetes mellitus</i> <sup>1</sup>		36 (30 %)	
<i>Arterielle Hypertonie</i> <sup>1</sup>		84 (69 %)	
<i>KV-Erkrankungen</i> <sup>1</sup>		49 (40 %)	

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), m (männlich), w (weiblich), BMI (Body-Mass-Index), KV-Erkrankungen (andere kardiovaskuläre Erkrankungen)  
Angaben: Angabe <sup>1</sup>: nominale Variablen: Absolute Anzahl (Anteil in %, gerundet auf ganze Zahlen), Chi-Quadrat-Test, hier ist  $p > 0,05$  signifikant; Angabe <sup>2</sup>: intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand), Mann-Whitney-U-Test.

Die laborchemischen Ergebnisse der CKD-Patienten aus Vollblut (VB), Plasma (P) und Spontanurin (SU) sind in Tab. 15 aufgeführt. Auch von der Kontrollgruppe wurden die Parameter aus Vollblut und Plasma ausgewertet, es waren jedoch keine Spontanurin-Proben vorhanden. Gruppenvergleiche für die verschiedenen Parameter wurden für Patienten- und Kontrollgruppe durchgeführt und sind ebenfalls in Tab. 15 zusammengefasst. In den nachfolgenden Ergebnisabschnitten wird detaillierter darauf eingegangen.

Aufgrund fehlender Vollblut-Proben konnte bei acht Patienten weder die Hämoglobin-Konzentration noch der Hämatokrit, die Erythrozytenzahl, das MCV, das MCH und die MCHC bestimmt werden. Bei 72 Kontrollpersonen konnte wegen erst später durchgeführtem Systemwechsel (siehe Abschnitt 2.2) keine Bestimmung von MCH und MCHC erfolgen. Die Erythropoetin-Konzentration eines Patienten konnte laborchemisch nicht bestimmt werden. Die P-Eiweiß-, P-Albumin-, P-Harnsäure- und Laktatdehydrogenase- (LDH-) Konzentrationen wurden nur bei klinischer Notwendigkeit ermittelt und sind daher nicht von allen Patienten vorhanden. Bei fünf CKD-Patienten konnte keine Spontanurin-Probe gewonnen werden, weshalb für diese Patienten keine Kreatinin-Konzentration im Spontanurin und damit keine Proteinurie und Albuminurie bekannt sind.

**Tab. 15: Laborchemische Ergebnisse der Studienteilnehmer aus Vollblut (VB), Plasma (P) und Spontanurin (SU)**

<b>Laborparameter</b>	<b>Kontrollgruppe (n = 133)</b>	<b>CKD-Patienten (n = 122)</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Kreatinin (P, mg/dl)</i> <sup>2</sup>	0,7 (0,2)	1,6 (1)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Cystatin C (P, mg/l)</i> <sup>2</sup>	1,0 (0,2)	2,05 (1,3)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>eGFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, CKD-EPI<sub>Krea-Cys</sub>)</i> <sup>2</sup>	91 (24)	34 (25)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>eGFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, CKD-EPI<sub>Krea</sub>)</i> <sup>2</sup>	100 (21)	42 (31)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Hämoglobin (VB, g/dl)</i> <sup>2</sup>	13,8 (1,8)	12,4 (2,6) (n = 114)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Hämoglobin, m (VB, g/dl)</i> <sup>2</sup>	14,8 (1,3) (n = 62)	13,1 (3,3) (n = 56)	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Hämoglobin, w (VB, g/dl)</i> <sup>2</sup>	13,1 (0,9) (n = 71)	11,9 (2,2) (n = 58)	<b>&lt; 0,001</b>

Hämatokrit (VB, %) <sup>1</sup>	42,2 ± 4,9	36,3 ± 5,9 (n = 114)	< 0,001
Erythrozytenzahl (VB, Mio/ $\mu$ l) <sup>1</sup>	4,75 ± 0,6	4,17 ± 0,73 (n = 114)	< 0,001
MCV (VB, fl) <sup>1</sup>	89 ± 4	88 ± 6 (n = 114)	0,0235
MCH (VB, pg) <sup>2</sup>	29 (2,3) (n = 61)	29,9 (2,6) (n = 114)	0,1173
MCHC (VB, g/dl) <sup>1</sup>	33,1 ± 0,87 (n = 61)	34 ± 1,21 (n = 114)	< 0,001
CRP (P, mg/dl) <sup>2</sup>	0,06 (0,13)	0,21 (0,62)	< 0,001
Eisen (P, $\mu$ g/dl) <sup>2</sup>	94 (64)	72 (37)	< 0,001
Ferritin (P, $\mu$ g/dl) <sup>2</sup>	2,3 (2,6)	7,3 (11,9)	< 0,001
Transferrin (P, mg/dl) <sup>2</sup>	275 (44)	229 (58)	< 0,001
TfS (%) <sup>2</sup>	24 (17)	23 (14)	0,5278
Erythropoetin (P, mU/ml) <sup>2</sup>	10 (5)	10 (8) (n = 121)	0,8501
Eiweiß (P, g/dl) <sup>1</sup>		6,8 ± 0,5 (n = 85)	
Albumin (P, g/dl) <sup>2</sup>		3,8 (0,6) (n = 28)	
Harnsäure (P, mg/dl) <sup>1</sup>		7,3 ± 2,2 (n = 64)	
Laktatdehydrogenase (P, U/l) <sup>2</sup>		188 (54) (n = 105)	
Kreatinin (SU, mg/dl) <sup>2</sup>		40 (37) (n = 117)	
Proteinurie (SU, mg/g Kreatinin) <sup>2</sup>		313 (1135) (n = 117)	
Albuminurie (SU, mg/g Kreatinin) <sup>2</sup>		191 (1336) (n = 117)	

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), m (männlich), w (weiblich), MCV (mittleres Erythrozyteneinzelvolumen), MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin), MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration), CRP (C-reaktives Protein), TfS (Transferrin-Sättigung)  
Angaben: Angabe <sup>1</sup>: intervallskalierte, normalverteilte Variablen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, zweiseitiger ungerichteter t-Test; Angabe <sup>2</sup>: intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand), Mann-Whitney-U-Test.  
Für die Personenanzahl (n) siehe erste Zeile, außer anders angegeben. Tabelle in ähnlicher Form veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Die Arzneimittelaufnahme der Patientenkohorte ist in Tab. 16 dargestellt, dabei wurden die in Absatz 2.7.2 zusammengefassten Arzneimittelgruppen verwendet. Für die Eisentherapie wurde separat die Einnahmearart ausgewertet: 13 Patienten nahmen zum Messzeitpunkt Eisen peroral zu sich und vier Patienten Eisen

intravenös. Davon gab ein Patient beide Einnahmearten an. Vereinzelt wurden auch in der Kontrollgruppe Arzneimittel eingenommen, diese sind ebenfalls in Tab. 16 aufgeführt.

**Tab. 16: Arzneimitteleinnahme der Studienteilnehmer**

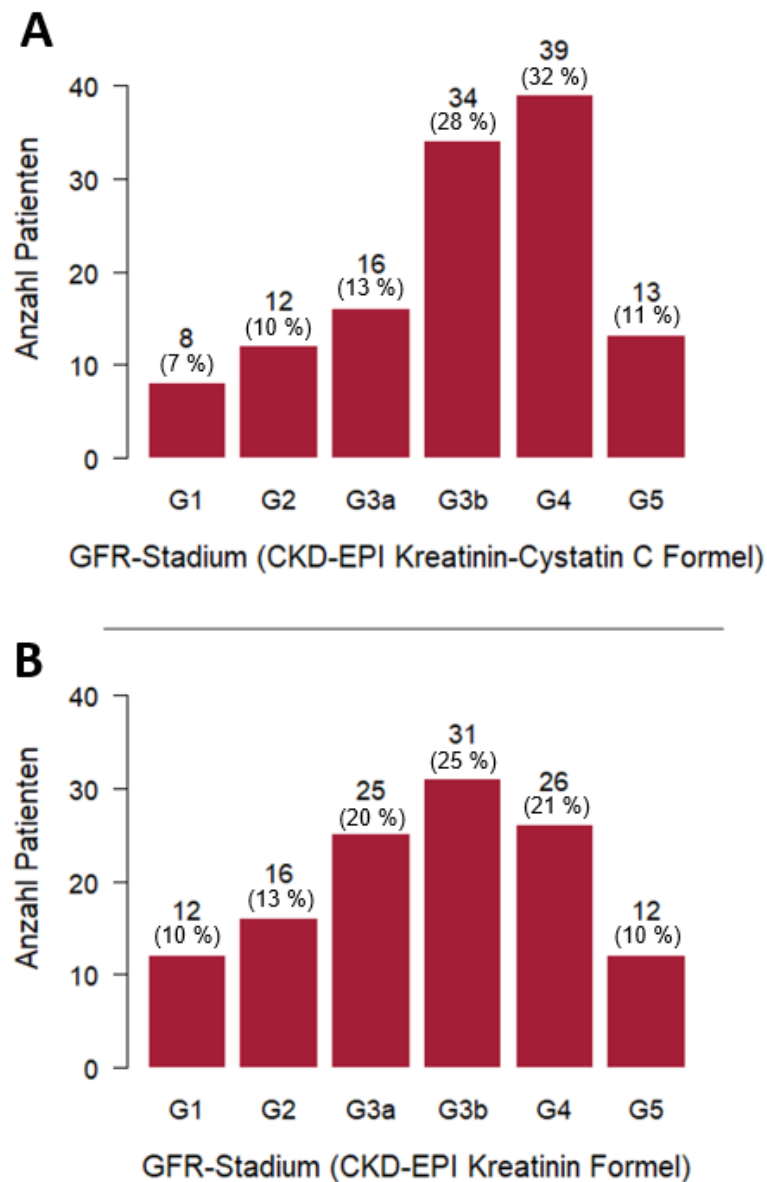
<b>Arzneimittelgruppe</b>	<b>Kontrollgruppe (n = 133)</b>	<b>CKD-Patienten (n = 122)</b>
<i>Diuretika</i>	1 (1 %)	73 (60 %)
<i>RAAS-Hemmer</i>	4 (3 %)	89 (73 %)
<i>Betablocker</i>	2 (2 %)	50 (41 %)
<i>Calciumantagonisten</i>	3 (2 %)	49 (40 %)
<i>„Andere Antihypertensiva“</i>		26 (21 %)
<i>Eisen (Gesamt)</i>		16 (13 %)
<i>Eisen (peroral)</i>		13 (11 %)
<i>Eisen (intravenös)</i>		4 (3 %)
<i>ESA</i>		9 (7 %)
<i>Antibiotika</i>		6 (5 %)
<i>Immunsuppressiva</i>		26 (21 %)
<i>Antikoagulantien</i>		54 (44 %)
<i>Protonenpumpeninhibitoren</i>	1 (1 %)	36 (30 %)
<i>Antidiabetika / Insulin</i>		24 (20 %)
<i>Phosphatbinder</i>		9 (7 %)
<i>Vitamin D</i>		64 (52 %)
<i>Bikarbonat</i>		22 (18 %)
<i>Thyroxin</i>	10 (8 %)	33 (27 %)
<i>Antidepressiva / Antipsychotika</i>		8 (7 %)
<i>Cholesterinsenker</i>		56 (46 %)

*Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron System), ESA (Erythropoese-stimulierende Substanzen).*

*Angaben: nominale Variablen: Absolute Anzahl (Anteil in %, gerundet auf ganze Zahlen).*

### **3.2 Nierenfunktion von Patienten und Kontrollgruppe und Ätiologie der Nierenkrankheit**

In die Studie eingeschlossen wurden 122 chronisch nierenkranke, nicht-dialysepflichtige Patienten aller CKD-Stadien. Die mithilfe der CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel bestimmte eGFR der Patienten (Md = 34 (IQR = 25) ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) unterschied sich signifikant von der eGFR der Kontrollpersonen (91 (24) ml/min/1,73 m<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) (siehe Abb. 6 A für die hiernach erfolgte Einteilung der CKD-Patienten in die CKD-Stadien). Vergleichend wurden die Berechnungen auch mit der CKD-EPI Kreatinin Formel durchgeführt, dabei ergab sich in beiden Gruppen numerisch eine etwas bessere Nierenfunktion mit einer eGFR der Patienten von 42 (31) ml/min/1,73 m<sup>2</sup> und der Kontrollpersonen von 100 (21) ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (siehe Abb. 6 B).



**Abb. 6: Verteilung der Patienten auf die CKD-Stadien**

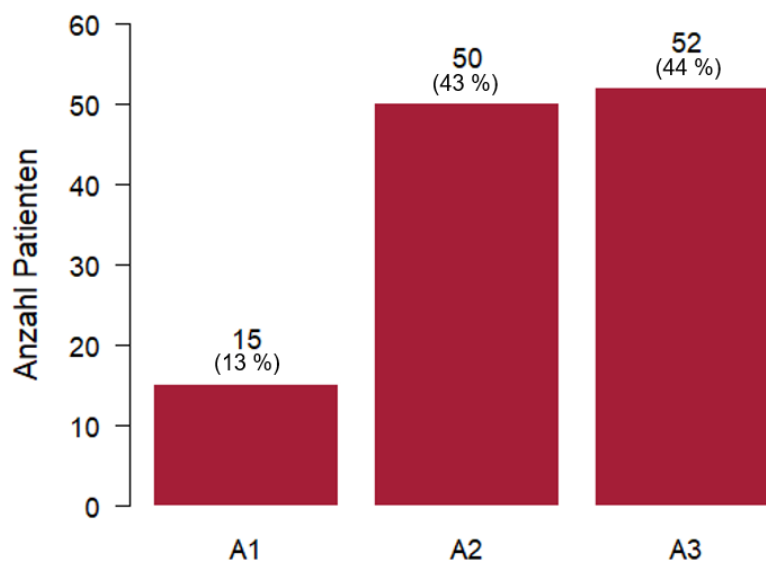
Die Berechnung der eGFR erfolgte bei Abbildung A mit der CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel und vergleichend bei Abbildung B mit der CKD-EPI Kreatinin Formel.

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), GFR (glomeruläre Filtrationsrate), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)

Angaben: Absolute Anzahl (Anteil in % aller 122 CKD-Patienten, gerundet auf ganze Zahlen). Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint.

Die berechnete Albuminurie der Patienten (Md = 191 (IQR = 1336) mg/g Kreatinin ( $n = 117$ )) führte zu einer Einteilung von 15 Patienten (13 %) in Stadium A1 (normal bis mäßig erhöht, 7 (15) mg/g Kreatinin), 50 Patienten (43 %) in Stadium A2 (mäßig erhöht, 75 (92) mg/g Kreatinin) und 52 Patienten (44 %) in Stadium

A3 (stark erhöht und nephrotischer Bereich, 1829 (2261) mg/g Kreatinin) (siehe Abb. 7), davon fielen 21 Patienten (40 %) in den nephrotischen Bereich (3914 (2995) mg/g Kreatinin). Bei fünf Patienten war kein Spontanurin vorhanden, dadurch ist bei diesen Patienten das Albuminurie-Stadium nicht bekannt. Die Nierenfunktion der CKD-Patienten in den unterschiedlichen Albuminurie-Stadien ist in Tab. 18 (Abschnitt 3.5) dargestellt, die eGFR nahm mit zunehmendem Albuminurie-Stadium ab, diese Unterschiede waren aber nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ).



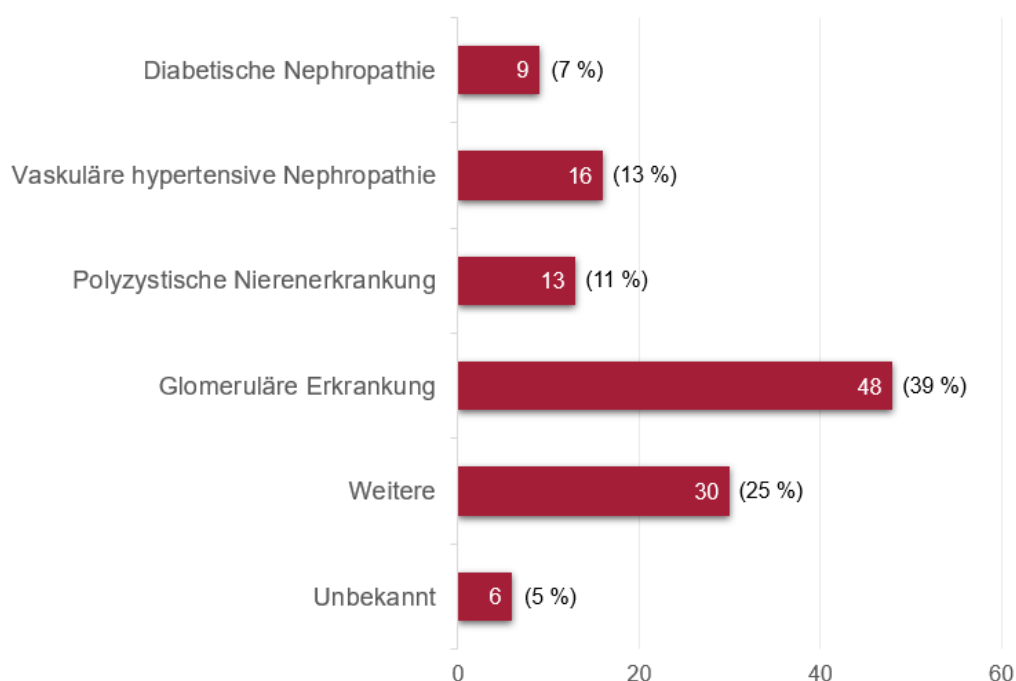
**Abb. 7: Verteilung der CKD-Patienten auf die Albuminurie-Stadien**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit)

Angaben: Absolute Anzahl (Anteil in % von 117 Patienten), bei fünf Patienten war kein Spontanurin vorhanden, dadurch war das Albuminurie-Stadium nicht bekannt. 21 Patienten aus Stadium A3 fielen in den nephrotischen Bereich. Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint.

Die Ursachen der chronischen Nierenkrankheit der Patienten waren vielfältig, neun Patienten hatten eine diabetische Nephropathie, 16 eine vaskuläre hypertensive Nephropathie und 13 eine polyzystische Nierenkrankheit (autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit (engl.: autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) oder multizystische Nierendysplasie (engl.: multicystic dysplastic kidney, MCDK)). Bei 48 Patienten waren eine glomeruläre Erkrankung oder Glomerulonephritis ursächlich, darunter wurden folgende Erkrankungen zusammengefasst: IgA-Nephropathie ( $n = 16$ ),

Lupus Nephritis ( $n = 4$ ), Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN,  $n = 1$ ), ANCA-assoziierte mikroskopische Polyangiitis (Granulomatose mit Polyangiitis, RPGN (engl.: rapidly progressive glomerulonephritis),  $n = 9$ ), RPGN Typ II ( $n = 1$ ), Minimal Change Glomerulonephritis (MCGN,  $n = 4$ ), Membranöse Glomerulo-nephritis ( $n = 6$ ), Glomerulosklerose (ischämisch oder podozytopathisch,  $n = 4$ ), Syndrom der dünnen Basalmembran ( $n = 2$ ) und Morbus Alport ( $n = 1$ ). Die chronische Nierenkrankheit von 30 Patienten wurde durch weitere Ursachen bedingt (Interstitielle Nephritis ( $n = 5$ ), tubulointerstitielle Schädigungen ( $n = 2$ ), kardio-renales Syndrom ( $n = 1$ ), Fanconi-Syndrom ( $n = 1$ ), Myelomniere ( $n = 1$ ), Nephrosklerose ( $n = 4$ ), Phosphat-Diabetes oder eine Nephrokalzinose anderer Genese ( $n = 3$ ), prärenale Genese ( $n = 1$ ), postrenale Schädigungen ( $n = 7$ ), Nierenarterienstenose oder Nierenarteriendissektion ( $n = 2$ ), infantile nephro-pathische Cystinose ( $n = 1$ ) und Nierendysplasie ( $n = 2$ )). Bei sechs der Patienten war die Ursache der chronischen Nierenkrankheit unbekannt (siehe Abb. 8).



**Abb. 8: Verteilung der Patienten nach Ätiologie ihrer chronischen Nierenkrankheit**  
Angaben: Nominale Variablen: Absolute Anzahl (Anteil in % aller 122 Patienten, auf ganze Zahlen gerundet). Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint.

In Tab. 17 ist die Verteilung der Patienten auf CKD- und Albuminurie-Stadien und mithilfe einer Farbkodierung die Prognose der CKD im jeweiligen Stadium dargestellt (KDIGO, 2013). Dabei hatten 83 Patienten (71 %) anhand dieser Einteilung ein sehr hohes Risiko für Mortalität und andere unerwünschte Ereignisse wie akutes Nierenversagen, Progression der CKD und kardiovaskuläre Ereignisse. 19 Patienten (16 %) wiesen ein hohes, 11 Patienten (10 %) ein mäßiges und 4 Patienten (3 %) ein niedriges Risiko auf.

**Tab. 17: Verteilung der Patienten auf CKD- und Albuminurie-Stadien und Prognose der CKD (CKD-Risikokategorien)**

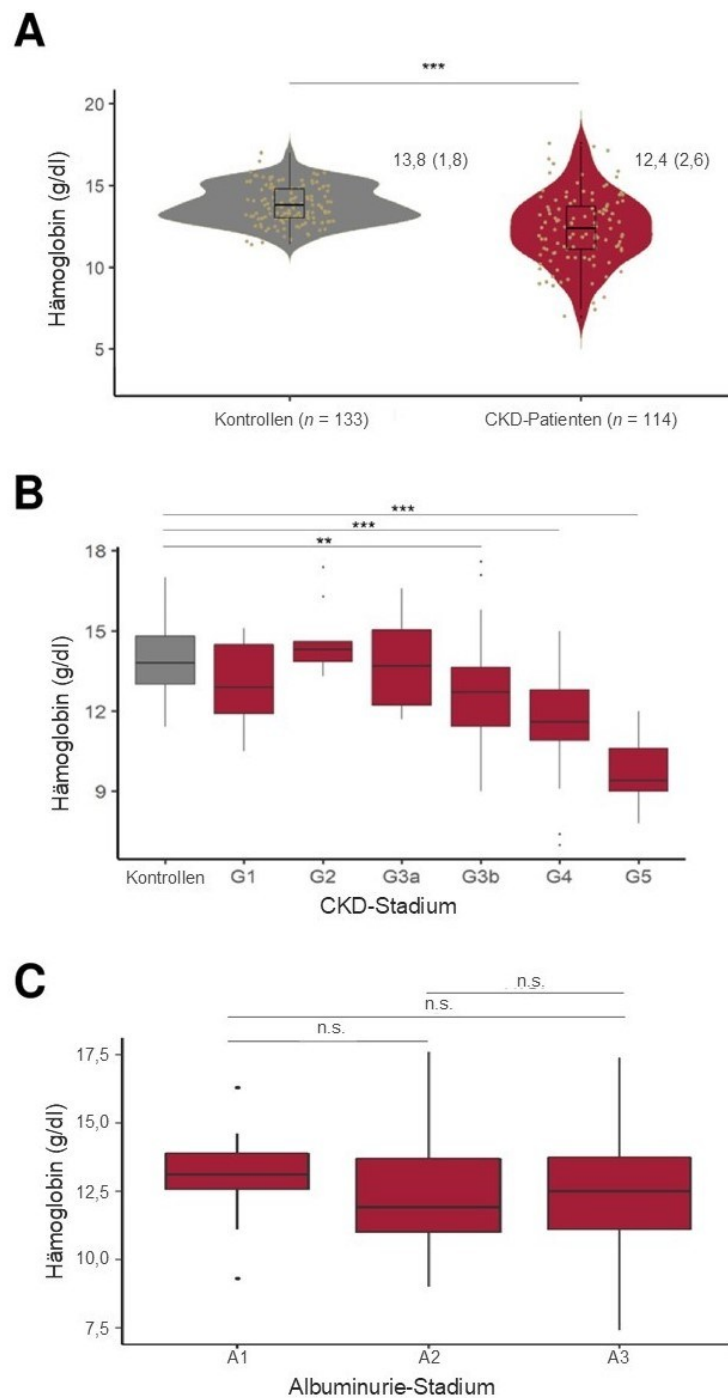
		Albuminurie-Stadien (mg/g Kreatinin)			
		A1 < 30 mg/g	A2 30 - 300 mg/g	A3 > 300 mg/g	
CKD-Stadien (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	<b>G1</b> ≥ 90	1 (1 %)	3 (3 %)	4 (3 %)	8 (7 %)
	<b>G2</b> 60 – 89	3 (3 %)	5 (4 %)	4 (3 %)	12 (10 %)
	<b>G3a</b> 45 - 59	3 (3 %)	8 (7 %)	5 (4 %)	16 (14 %)
	<b>G3b</b> 30 - 44	3 (3 %)	15 (13 %)	14 (12 %)	32 (27 %)
	<b>G4</b> 15 - 29	4 (3 %)	18 (15 %)	15 (13 %)	37 (32%)
	<b>G5</b> < 15	1 (1 %)	1 (1 %)	10 (9 %)	12 (10 %)
		15 (13 %)	50 (43 %)	52 (44 %)	117 (100 %)

Abkürzungen: GFR (glomeruläre Filtrationsrate), CKD (chronische Nierenkrankheit)  
 Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); n = 117 (bei n = 5 Patienten kein Albuminurie-Stadium bekannt); Absolute Anzahl (Anteil in %, gerundet auf ganze Zahlen) der CKD-Patienten in den verschiedenen CKD- und Albuminurie-Stadien;  
 Farbkodierung entspricht den unterschiedlichen Risikograden für Mortalität und andere unerwünschte Ereignisse, wie eine akute Nierenfunktionseinschränkung (engl.: acute kidney injury, AKI) und eine Progression der CKD, grün: niedriges Risiko, gelb: mäßiges Risiko, orange: hohes Risiko, rot: sehr hohes Risiko (KDIGO, 2013).

### 3.3 Anämieparameter und Untersuchung auf univariate Korrelation mit der eGFR

Die untersuchte Patientenkohorte wies im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Hämoglobin-Konzentrationen auf (Md = 12,4 (IQR = 2,6) g/dl bei den CKD-Patienten und 13,8 (1,8) g/dl in der Kontrollgruppe,  $p < 0,001$ , siehe Abb. 9 A). Dabei war die Hb-Konzentration CKD-stadienabhängig vermindert (siehe Abb. 9 B und Abschnitt 3.5, Tab. 18), in den Albuminurie-Stadien fanden sich keine signifikanten Hb-Unterschiede (siehe Abb. 9 C und Abschnitt 3.5, Tab. 18).

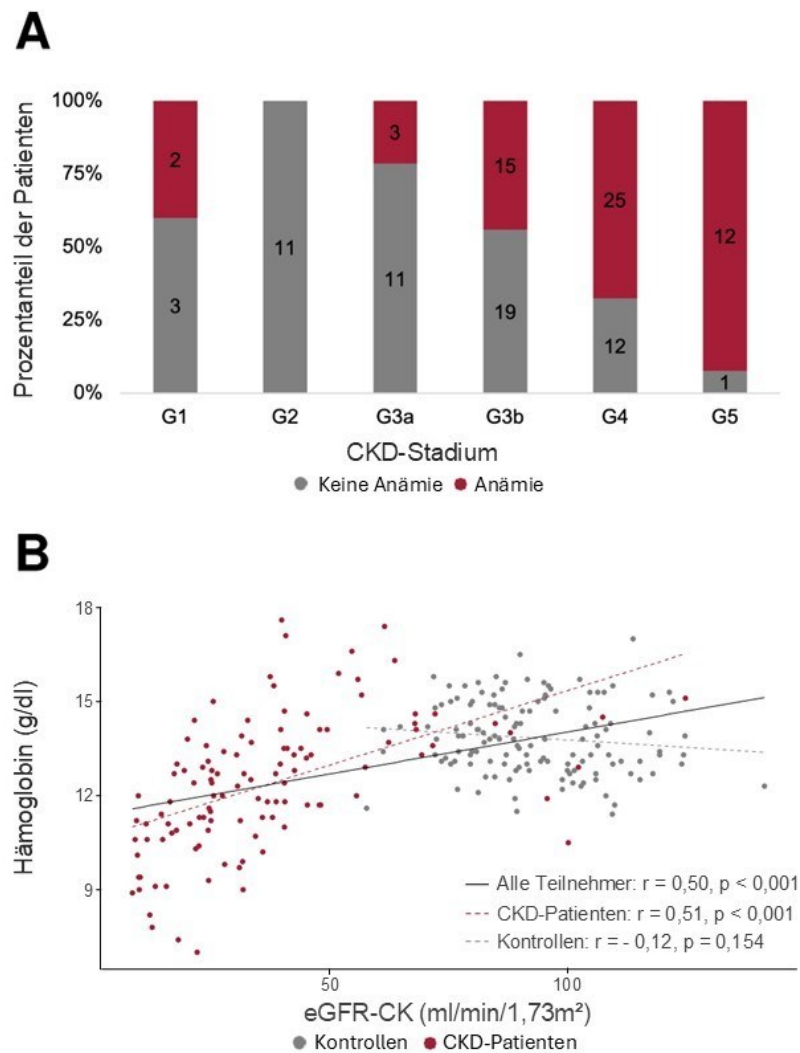
Die Hb-Konzentration der männlichen Patienten (13,1 (3,3) g/dl) unterschied sich signifikant von der der männlichen Kontrollpersonen (14,8 (1,3) g/dl,  $p < 0,001$ ) und auch die Hb-Konzentration der Patientinnen (11,9 (2,2) g/dl) war signifikant niedriger als die der weiblichen Kontrollpersonen (13,1 (0,9) g/dl,  $p < 0,001$ ). In Abb. 10 A ist die Einteilung in die Kategorien ‚Anämie‘ oder ‚keine Anämie‘ anhand der geschlechtsspezifischen Hb-Normwerte erfolgt. Dabei hatten 50 % der CKD-Patienten eine Anämie. Der Prozentanteil anämischer Patienten nahm mit steigendem CKD-Stadium zu (siehe Abb. 10 A), wobei in Stadium G1 überproportional viele Patienten eine Anämie aufwiesen ( $n = 2$ ). Die Hb-Konzentration korrelierte univariat signifikant positiv mit der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) der Gesamtkohorte ( $r = 0,5$ ,  $p < 0,001$ ), diese Korrelation fand sich auch bei den Patienten ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,001$ , siehe Abb. 10 B). Patienten mit der Komorbidität Diabetes mellitus hatten eine höhere Anämie-Prävalenz (60 %), wiesen aber auch eine schlechtere Nierenfunktion auf (Md = 27 (IQR = 19) ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, im Vergleich zu 34 (25) ml/min/1,73 m<sup>2</sup> der Gesamtpatienten).



### Abb. 9: Gruppenvergleiche der Hämoglobin-Konzentration

B: Weitere signifikante Gruppenunterschiede: G2 - G3b \*, G2 - G4 \*\*\*, G2 - G5 \*\*\*, G3a - G4 \*\*, G3a - G5 \*\*\*, G3b - G5 \*\*\*, G4-G5 \*.

Angaben: Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variable: A: Mann-Whitney-U-Test, Median (Interquartilsabstand); B und C: Kruskal-Wallis-Test, paarweise Wilcoxon Post-hoc-Analyse, Bonferroni Korrektur. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

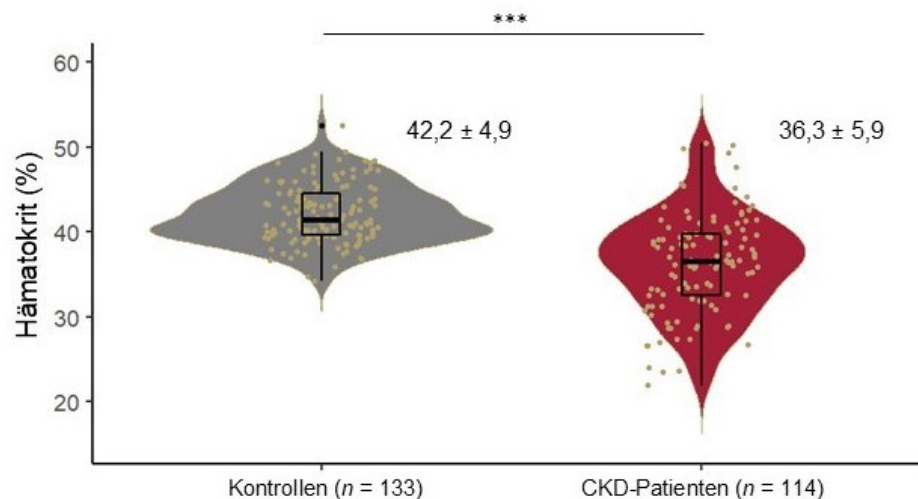


**Abb. 10: Anämie nach CKD-Stadium und univariate Korrelation zwischen Hämoglobin-Konzentration und eGFR**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), GFR (glomeruläre Filtrationsrate), eGFR-CK (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate nach CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel)

Angaben: A: Anzahl und Prozentanteil der CKD-Patienten mit / ohne Anämie nach geschlechtsspezifischen Hb-Normwerten, insgesamt 114 CKD-Patienten, da von acht Patienten keine Hb-Konzentration bekannt; B: Intervallskalierte Variablen: Pearson-Korrelationstest, Korrelationskoeffizient  $r$ , grafische Darstellung mit Punktwolke und linearer Anpassung, CKD-Patienten rot ( $n = 114$ ), Kontrollpersonen grau ( $n = 133$ ). Eigene Abbildungen, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Der Hämatokrit der Patienten war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ( $36,3 \pm 5,9$  % (M  $\pm$  SD) in der CKD- und  $42,2 \pm 4,9$  % in der Kontrollgruppe,  $p < 0,001$ , siehe Abb. 11) und war ebenfalls CKD-stadienabhängig ( $37,1 \pm 5,2$  % in Stadium G1,  $41,5 \pm 3,5$  % in Stadium G2,  $39,9 \pm 4,9$  % in Stadium G3a,  $37,7 \pm 5,6$  % in Stadium G3b,  $34,5 \pm 5$  % in Stadium G4 und  $29,2 \pm 3,8$  % in Stadium G5). Dabei fanden sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den CKD-Stadien G3b, G4, G5 (jeweils  $p < 0,001$ , \*\*\*), außerdem zwischen G1 und G5 ( $p = 0,007$ , \*\*), G2 und G4, G5 ( $p < 0,001$ , \*\*\*), G3a und G4 ( $p = 0,0011$ , \*\*), G3a und G5 ( $p < 0,001$ , \*\*\*), G3b und G4 ( $p = 0,028$ , \*), G3b und G5 ( $p < 0,001$ , \*\*\*) und G4 und G5 ( $p = 0,0018$ , \*\*).



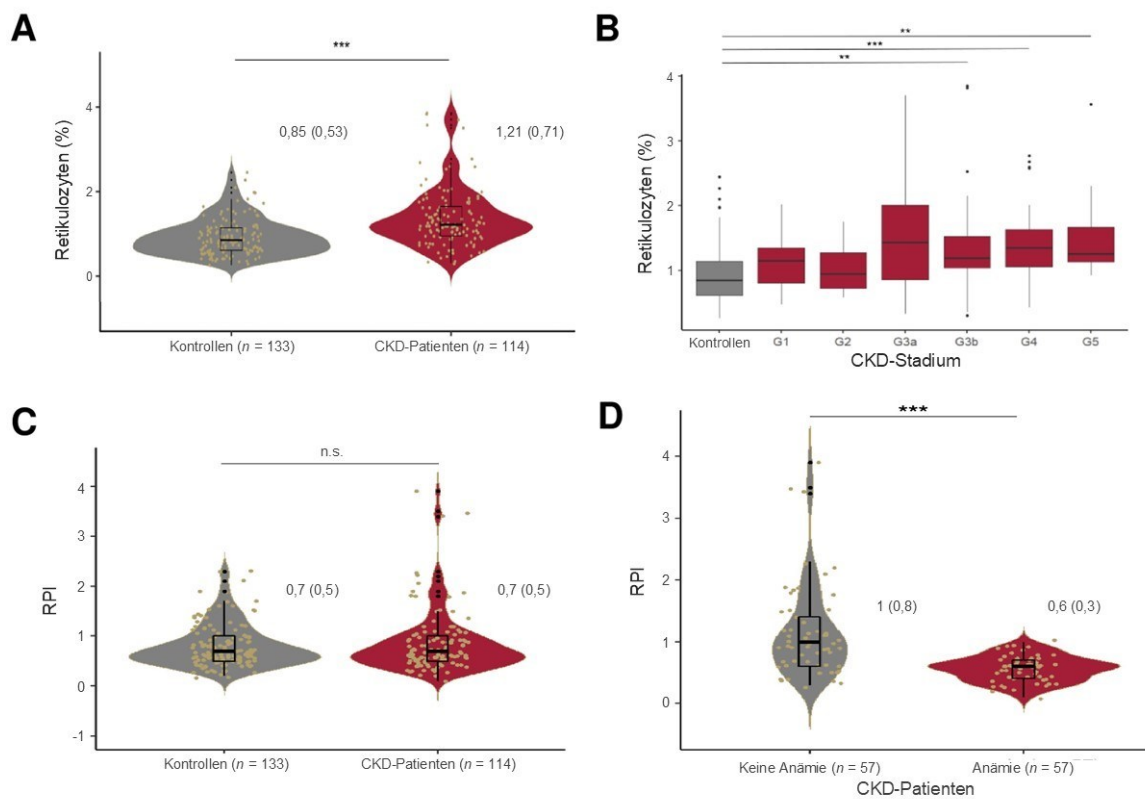
**Abb. 11: Gruppenvergleich der Hämatokrit-Konzentration**

Angaben:  $n$  = Personenanzahl; Intervallskalierte, normalverteilte Variable: Zweiseitiger  $t$ -Test, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \*\*\*  $p < 0,001$ . Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildung veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Die Erythrozyten der Patienten wiesen signifikant weniger Volumen (MCV) auf als die der Kontrollgruppe ( $88 \pm 6$  fl (M  $\pm$  SD) in der CKD- und  $89 \pm 4$  fl in der Kontrollgruppe,  $p < 0,05$ ), der MCH-Wert war dagegen nicht erniedrigt (Md = 29,9 (IQR = 2,6) pg und 29 (2,3) pg,  $p \geq 0,05$ ). Dabei waren die Erythrozyten normozytär und normochrom. Die MCHC war in der Patientengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $34 \pm 1,21$  g/dl (M  $\pm$  SD) und  $33,1 \pm 0,87$  g/dl,  $p < 0,001$ ). Die Erythrozyten der CKD-Patienten mit Anämie waren ebenfalls normozytär ( $88 \pm 6$  fl (M  $\pm$  SD)) und normochrom (Md = 29,8 (IQR = 2,8) pg).

### **3.4 Bestimmung der Retikulozytenzahl und der Erythropoetin-Konzentration**

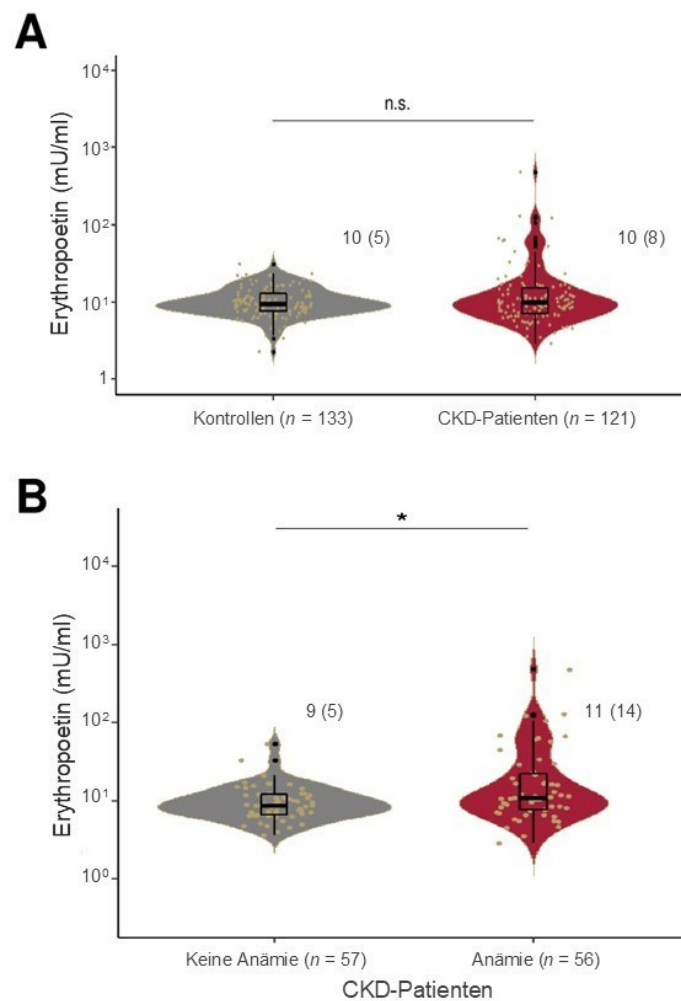
Nach der durchflusszytometrischen Bestimmung der Retikulozytenzahl konnte diese in der Patienten- und Kontrollgruppe verglichen werden. Die Anämie der Patienten bestand trotz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigerter Retikulozytenzahlen (Md = 1,21 (IQR = 0,71) % bei den CKD-Patienten und 0,85 (0,53) % bei der Kontrollgruppe,  $p < 0,001$ , siehe Abb. 12 A). Diese Steigerung war CKD-stadienabhängig (1,15 (0,54) % in Stadium G1, 0,95 (0,55) % in Stadium G2, 1,44 (1,16) % in Stadium G3a, 1,19 (0,49) % in Stadium G3b, 1,35 (0,58) % in Stadium G4 und 1,26 (0,54) % in Stadium G5) (siehe Abb. 12 B). Der Retikulozytenproduktionsindex zeigte sich bei den Patienten nicht adäquat erhöht (0,7 (0,5) bei den CKD-Patienten und 0,7 (0,5) bei den Kontrollpersonen) (siehe Abb. 12 C). Dabei wiesen die Patienten mit Anämie durchschnittlich einen niedrigeren RPI auf (0,6 (0,3)), als Patienten ohne Anämie (1 (0,8)) (siehe Abb. 12 D).



**Abb. 12: Gruppenvergleiche der Retikulozytenzahl**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit) RPI (Retikulozytenproduktionsindex)  
 Angaben: Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variable: A, C und D:  $n$  = Personenanzahl, Mann-Whitney-U-Test, Median (Interquartilsabstand); B: Kruskal-Wallis-Test, paarweise Wilcoxon Post-hoc-Analyse, Bonferroni Korrektur. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .  
 Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Die Erythropoetin-Konzentration im Plasma war nicht erhöht (Md = 9,9 (IQR = 8) mU/ml und 9,5 (5,3) mU/ml,  $p \geq 0,05$ ). Dabei fand sich allerdings bei vierzehn Patienten (CKD-Stadien G1, G3b bis G5) eine EPO-Konzentration  $> 30$  mU/ml, wobei vier Patienten davon zum Messzeitpunkt eine ESA-Therapie erhielten. Die EPO-Konzentration von nur einer Kontrollperson war  $> 30$  mU/ml. Der Gruppenvergleich von CKD-Patienten und Kontrollpersonen ist in Abb. 13 A dargestellt. Dabei wiesen die Patienten mit Anämie durchschnittlich eine höhere EPO-Konzentration auf (11 (14)), als Patienten ohne Anämie (9 (5)), siehe Abb. 13 B).



**Abb. 13: Gruppenvergleich der Erythropoetin-Konzentration im Plasma**

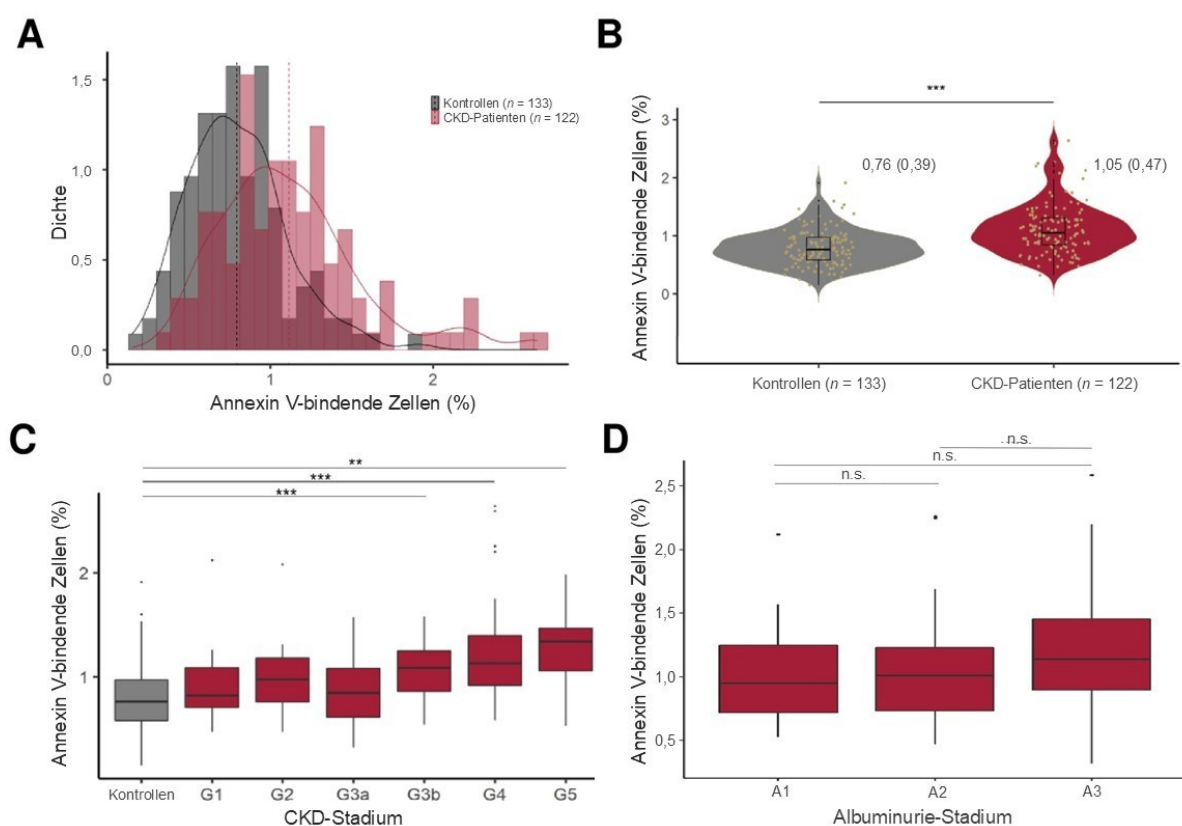
Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit)

Angaben: Plasma-Erythropoetin-Konzentration; Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variable: Mann-Whitney-U-Test, Median (Interquartilsabstand). n.s.  $p \geq 0,05$ . Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

### 3.5 Untersuchung der Eryptoserate, univariate Korrelation mit eGFR und Hb-Konzentration

Mithilfe der durchflusszytometrischen Messung der Phosphatidylserin-Exposition über die Annexin V FITC-Fluoreszenz (siehe beispielhaft Absatz 2.5.3, Abb. 4) konnte bei den Patienten eine gesteigerte Eryptoserate ausgemacht werden.

Die Eryptoserate war bei den Patienten signifikant höher als bei den Kontrollpersonen (Md = 1,05 (IQR = 0,47) % Annexin V-bindende Zellen bei den Patienten und 0,76 (0,39) % bei den Kontrollpersonen,  $p < 0,001$ , siehe Abb. 14 A und B) und nahm mit zunehmendem CKD-Stadium zu (siehe Abb. 14 C und Tab. 18). Dabei fanden sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den Stadien G3b, G4 ( $p < 0,001$ , \*\*\*) und G5 ( $p = 0,0013$ , \*\*). Außerdem fand sich eine Zunahme der Eryptoserate mit steigendem Albuminurie-Stadium der CKD-Patienten (siehe Abb. 14 D und Tab. 18), diese Gruppenunterschiede waren allerdings nicht signifikant.



**Abb. 14: Gruppenvergleiche der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen)**

Angaben: n = Personenanzahl, A: Darstellung als Histogramme mit Dichtefunktion, Median als gestrichelte Linie; intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variable: B: Mann-Whitney-U-Test, Median (Interquartilsabstand); C und D: Kruskal-Wallis-Test, paarweise Wilcoxon Post-hoc-Analyse, Bonferroni Korrektur. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied der Eryptoserate bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Studienteilnehmern (weibliche Studienteilnehmer 0,85 (0,52) % Annexin V-bindende Zellen und männliche Studienteilnehmer 0,95 (0,44) %,  $p > 0,05$ ). Die Eryptoserate der CKD-Patientinnen (1,02 (0,49) %) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Eryptoserate der CKD-Patienten (1,09 (0,52) %,  $p > 0,05$ ).

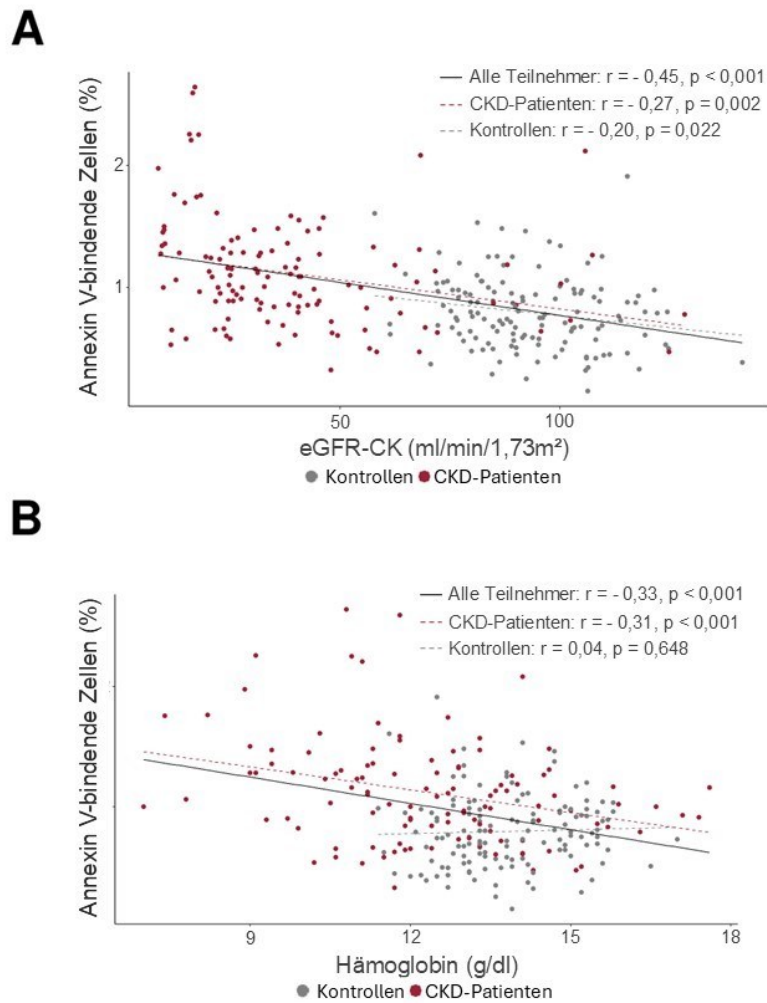
**Tab. 18: eGFR, Hämoglobin-Konzentration und Eryptoserate nach CKD- und Albuminurie-Stadium**

<b>Gruppe</b>	<b>eGFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	<b>Annexin V- Bindung (%)</b>
<i>k</i> (n = 133)	91 (24)	13,8 (1,8)	0,76 (0,39)
<i>Gesamt-Pat.</i> (n = 122)	34 (25)	12,4 (2,6) (n = 114)	1,05 (0,47)
<i>G1</i> (n = 8)	104 (13)	12,9 (2,6) (n = 5)	0,82 (0,38)
<i>G2</i> (n = 12)	68 (6)	14,3 (0,8) (n = 11)	0,98 (0,42)
<i>G3a</i> (n = 16)	49 (10)	13,7 (2,8) (n = 14)	0,85 (0,47)
<i>G3b</i> (n = 34)	38 (8)	12,7 (2,2) (n = 34)	1,09 (0,39)
<i>G4</i> (n = 39)	23 (6)	11,6 (1,6) (n = 37)	1,13 (0,48)
<i>G5</i> (n = 13)	10 (2)	9,4 (1,6) (n = 13)	1,34 (0,41)
<i>A1</i> (n = 15)	40 (35)	13,1 (1,3) (n = 14)	0,95 (0,53)
<i>A2</i> (n = 50)	36 (26)	11,9 (2,7) (n = 45)	1,01 (0,5)
<i>A3</i> (n = 52)	31 (27)	12,5 (2,7) (n = 50)	1,14 (0,56)

*Abkürzungen: eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), k (Kontrollen), Pat. (Patienten)*

*Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand); für die Personenanzahl (n) siehe Gruppen-Spalte, außer anders angegeben.*

Die Eryptoserate korrelierte in der Gesamtkohorte univariat signifikant negativ mit der eGFR ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,001$ , Abb. 15 A) und der Hb-Konzentration ( $r = -0,33$ ,  $p < 0,001$ , Abb. 15 B). Diese Korrelationen fanden sich auch bei den Patienten (Eryptoserate und eGFR:  $r = -0,27$ ,  $p = 0,002$ ; Eryptoserate und Hb-Konzentration:  $r = -0,31$ ,  $p < 0,001$ ).



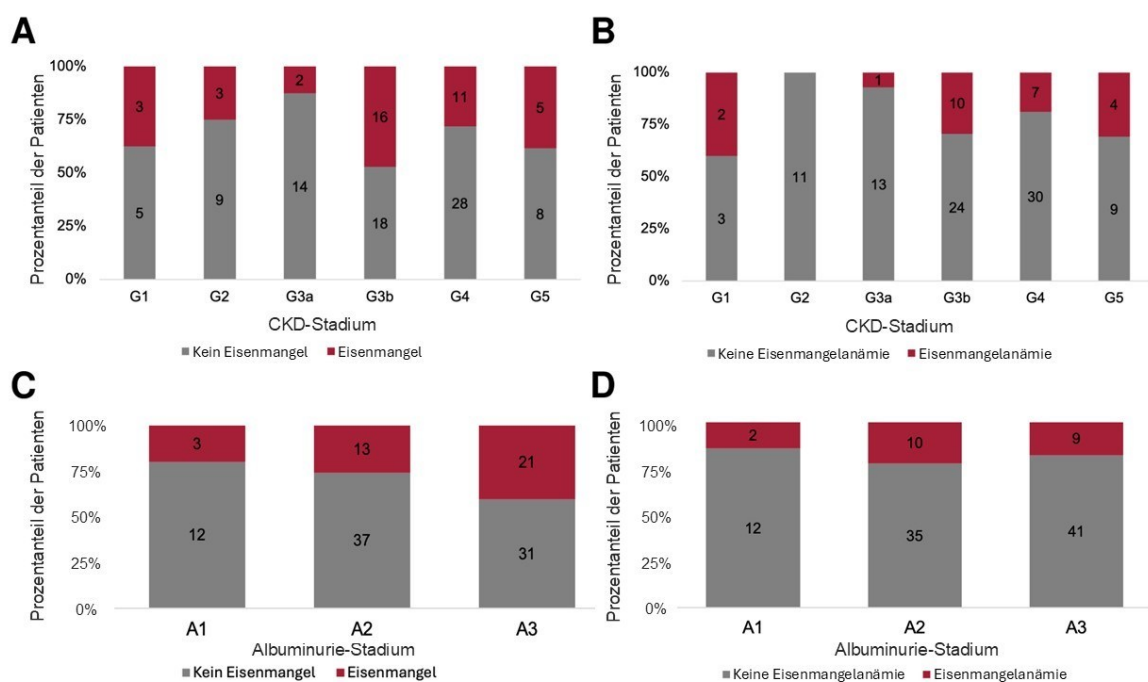
**Abb. 15: Univariate Korrelationen der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen) mit A: eGFR ( $n = 255$ ) und B: Hb ( $n = 247$ )**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), Hb (Hämoglobin)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); Intervallskalierte Parameter: Pearson-Korrelationstest, Korrelationskoeffizient  $r$ , grafische Darstellung mit Punktwolke und linearer Anpassung, Patienten rot, Kontrollpersonen grau. Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

### 3.5.1 Eisenstatus und univariate Korrelation mit GFR, Hb und Eryptoserate

Einen Eisenmangel (Transferrin-Sättigung  $\leq 20$  % und Ferritin  $\leq 10$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ , (KDIGO et al., 2012)) wiesen 40 CKD-Patienten auf (33 %,  $n = 122$ ), 24 hatten eine Eisenmangelanämie (21 %,  $n = 114$ , siehe Absatz 2.7.2). Dies war CKD- und Albuminurie-stadienabhängig (siehe Abb. 16). Bei 48 Kontrollpersonen fand sich ein Eisenmangel (36 %,  $n = 133$ ), davon hatten nur drei Personen eine Eisenmangelanämie (2 %).



**Abb. 16: Eisenmangel und Eisenmangelanämie nach CKD- und Albuminurie-Stadium**

Abkürzungen: CKD (chronische Nierenkrankheit), GFR (glomeruläre Filtrationsrate)  
 Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); A: Absolute Anzahl und Prozentanteil der Patienten im jeweiligen CKD-Stadium mit / ohne Eisenmangel, insgesamt 122 CKD-Patienten, Eisenmangel definiert als Transferrin-Sättigung  $\leq 20$  % und Ferritin  $\leq 10$   $\mu\text{g}/\text{dl}$  (KDIGO et al., 2012); B: Absolute Anzahl und Prozentanteil der Patienten mit / ohne Eisenmangelanämie im jeweiligen CKD-Stadium, insgesamt 114 CKD-Patienten (von 8 Patienten war keine Hb-Konzentration bekannt), Anämie definiert nach geschlechtsspezifischen Hb-Nomwerten, Eisenmangel definiert wie bei Abbildung A, Eisenmangelanämie bei Vorliegen der beiden Kriterien angenommen; C: Analog zu A, nur im jeweiligen Albuminurie-Stadium, insgesamt 117 CKD-Patienten (bei 5 Patienten kein Albuminurie-Stadium bekannt); D: Analog zu B, nur im jeweiligen Albuminurie-Stadium.  
 Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint. Abbildungen veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024).

Die Plasma-Ferritin-Konzentration der Patienten (Md = 7,3 (IQR = 11,9) µg/dl) war signifikant höher als die P-Ferritin-Konzentration der Kontrollpersonen (2,3 (2,6) µg/dl,  $p < 0,001$ ). Es fanden sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Kontrollen und den CKD-Stadien G2 ( $p = 0,02$ , \*), G3b ( $p = 0,014$ , \*), G4 ( $p < 0,001$ , \*\*\*) und G5 ( $p = 0,011$ , \*) (siehe Tab. 19). Die Transferrin-Sättigung unterschied sich nicht signifikant (23,1 (14,3) % in der CKD- und 24,3 (16,9) % in der Kontrollgruppe,  $p \geq 0,05$ ) und es gab keine Gruppenunterschiede zwischen den CKD-Stadien (siehe Tab. 19). Die Plasma-Eisen-Konzentration der Patienten (72 (37) µg/dl) war signifikant niedriger als die Eisen-Konzentration der Kontrollpersonen (94 (64) µg/dl,  $p < 0,001$ ), es fanden sich signifikante Gruppenunterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den Stadien G4 ( $p = 0,024$ , \*) und G5 ( $p = 0,029$ , \*). Auch die Plasma-Transferrin-Konzentration der Patienten war signifikant niedriger als die der Kontrollpersonen (229 (58) mg/dl und 275 (44) mg/dl,  $p < 0,001$ ). Signifikante Gruppenunterschiede bestanden zwischen der Kontrollgruppe und den Stadien G2 ( $p = 0,002$ , \*\*), G3a ( $p = 0,004$ , \*\*), G3b, G4 und G5 ( $p < 0,001$ , \*\*\*). Sowohl P-Eisen- als auch P-Transferrin waren dabei CKD-stadienabhängig verringert (siehe Tab. 19).

**Tab. 19: Eisenstatus-Parameter nach dem CKD-Stadium**

<b>Gruppe</b>	<b>Ferritin (P, µg/dl)</b>	<b>Transferrin- Sättigung (%)</b>	<b>Eisen (P, µg/dl)</b>	<b>Transferrin (P, mg/dl)</b>
<i>k</i> (n = 133)	2,3 (2,6)	24,3 (16,9)	94 (64)	275 (44)
G1 (n = 8)	6,7 (8,6)	26 (18,4)	105 (50)	299 (107)
G2 (n = 12)	9,1 (13,1)	32 (17,3)	87 (43)	212 (38)
G3a (n = 16)	4,3 (9)	25 (10,1)	72 (34)	234 (36)
G3b (n = 34)	5,2 (10,7)	21,3 (12,4)	71 (40)	233 (49)
G4 (n = 39)	10 (13,3)	24 (15,4)	73 (32)	223 (55)
G5 (n = 13)	6,4 (12,1)	19,4 (9,9)	60 (19)	209 (42)
<i>p</i> -Wert	<b>&lt; 0,001</b>	$\geq 0,05$	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>

Abkürzungen: GFR (glomeruläre Filtrationsrate), P (Plasma), k (Kontrollen)  
Angaben: Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand), Kruskal-Wallis-Test (*p*-Wert).

In der Gesamtkohorte korrelierte die P-Ferritin-Konzentration negativ mit der eGFR und positiv mit der Eryptoserate, in der Analyse der Patientenkohorte

waren diese Korrelationen nicht signifikant. Zwischen der Hb-Konzentration und P-Ferritin bestand keine signifikante Korrelation (siehe Tab. 20). Die Transferrin-Sättigung korrelierte in der Gesamtkohorte nicht signifikant mit der eGFR (bei den Patienten fand sich eine signifikant positive Korrelation) und der Eryptoserate, aber signifikant positiv mit der Hb-Konzentration (siehe Tab. 20). Die P-Eisen-Konzentration korrelierte univariat signifikant positiv mit der eGFR und der Hb-Konzentration und in der Gesamtkohorte signifikant negativ mit der Eryptoserate, bei den CKD-Patienten waren diese Korrelationen nicht signifikant (siehe Tab. 20). Zwischen der P-Transferrin-Konzentration und der eGFR bestand eine signifikant positive Korrelation, in der Gesamtkohorte korrelierte die P-Transferrin-Konzentration außerdem signifikant positiv mit der Hb-Konzentration und negativ mit der Eryptoserate, bei den CKD-Patienten war dies nicht signifikant (siehe Tab. 20). Das P-Ferritin und das P-Transferrin korrelierten dabei nicht signifikant mit der CRP-Konzentration im Plasma ( $r = 0,07$  und  $r = -0,1$ ,  $p > 0,05$ ). In Tab. 20 sind die univariaten Korrelationen der Eryptoserate mit den Eisenstatus-Parametern für die Gesamtkohorte und die Patienten getrennt aufgeführt.

**Tab. 20: Univariate Korrelation des Eisenstatus mit der eGFR, dem Hb-Konzentration und der Eryptoserate bei der Gesamtkohorte und den CKD-Patienten**

<b>Parameter</b>	<b>eGFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	<b>Annexin V- Bindung (%)</b>
<i>Ferritin (P, µg/dl)</i>	- <b>0,32, ***</b> (255) - 0,11, n.s. (122)	- 0,07, n.s. (247) 0,01, n.s. (114)	<b>0,19, **</b> (255) 0,07, n.s. (122)
<i>Transferrin- Sättigung (%)</i>	0,1, n.s. (255) <b>0,2, *</b> (122)	<b>0,21, ***</b> (247) <b>0,38, ***</b> (114)	- 0,09, n.s. (255) 0,005, n.s. (122)
<i>Eisen (P, µg/dl)</i>	<b>0,3, ***</b> (255) <b>0,35, ***</b> (122)	<b>0,31, ***</b> (247) <b>0,5, ***</b> (114)	- <b>0,2, **</b> (255) - 0,03, n.s. (122)
<i>Transferrin (P, mg/dl)</i>	<b>0,5, ***</b> (255) <b>0,27, **</b> (122)	<b>0,21, ***</b> (247) 0,03, n.s. (114)	- <b>0,25, ***</b> (255) - 0,11, n.s. (122)

Abkürzungen: eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), Hb (Hämoglobin), CKD (chronische Nierenkrankheit), P (Plasma)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Pearson-Korrelationstest, Gesamtkohorte: Korrelationskoeffizient  $r$ , Signifikanz ( $n$ ), CKD-Patienten: Korrelationskoeffizient  $r$ , Signifikanz ( $n$ ); n.s., nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.6 Univariate Korrelationen der eGFR, der Hb-Konzentration und der Eryptoserate mit demographischen, klinischen und laborchemischen Parametern

Die eGFR war bei CKD-Patienten mit Diabetes mellitus um 14 ml/min/1,73m<sup>2</sup> und bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen um 10 ml/min/1,73m<sup>2</sup> niedriger als bei Patienten ohne diese Komorbiditäten. CKD-Patienten, welche einen Beta-blocker einnahmen, hatten eine um 13 ml/min/1,73m<sup>2</sup> niedrigere eGFR, bei Eisen-Therapie war diese 19 ml/min/1,73m<sup>2</sup> und bei ESA-Therapie sogar 27 ml/min/1,73m<sup>2</sup> niedriger als bei Patienten ohne diese Medikation. Außerdem war die eGFR niedriger bei Patienten mit Einnahme von Antidiabetika / Insulin, Phosphatbindern, Vitamin D, Bikarbonat und Cholesterinsenken (Tab. 21). Die Hb-Konzentration von Patienten mit Diabetes mellitus oder weiblichem Geschlecht war um 1,1 g/dl niedriger als bei Patienten ohne diese Merkmale (Tab. 21). Bei Patienten mit Einnahme von Eisen, ESA, Antibiotika, PPI, Antidiabetika, ‚anderen Antihypertensiva‘, Bikarbonat und Cholesterinsenken war die Hb-Konzentration niedriger als bei Patienten ohne diese Medikation, während Patienten mit RAAS-Hemmer-Einnahme eine höhere Hb-Konzentration aufwiesen (Tab. 21). Die Eryptoserate (Annexin V-Bindung) war bei Patienten mit Vitamin D und Bikarbonat-Einnahme höher als bei Patienten ohne diese Medikation (Tab. 21).

**Tab. 21: Univariate Korrelationen von eGFR, Hb und Eryptoserate mit nominalen Variablen bei den CKD-Patienten**

<b>Parameter</b>	<b>eGFR (ml/min/ 1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	<b>Annexin V- Bindung (%)</b>
<i>Geschlecht (w - m)</i>	n.s.	<b>0,27, **</b> Δ = 1,1	n.s.
<i>Diabetes mellitus (0 - 1)</i>	<b>- 0,25, **</b> Δ = - 14	<b>- 0,23, *</b> Δ = - 1,1	n.s.
<i>Arterielle Hypertonie (0 - 1)</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>‚Andere kardiovaskuläre Erkrankungen‘ (0 - 1)</i>	<b>- 0,2, *</b> Δ = - 10	n.s.	n.s.
<i>Diuretika (0 - 1)</i>	n.s.	n.s.	n.s.

RAAS-Hemmer (0 - 1)	n.s.	<b>0,21, *</b> $\Delta = 1$	n.s.
Betablocker (0 - 1)	<b>- 0,26, **</b> $\Delta = - 13$	n.s.	n.s.
Calciumantagonisten (0 - 1)	n.s.	n.s.	n.s.
„Andere Antihypertensiva“ (0 - 1)	n.s.	<b>- 0,19, *</b> $\Delta = - 1$	n.s.
Eisentherapie (0 - 1)	<b>- 0,25, **</b> $\Delta = - 19$	<b>- 0,19, *</b> $\Delta = - 1,1$	n.s.
Erythropoese-stimulierende Substanzen (ESA) (0 - 1)	<b>- 0,28, **</b> $\Delta = - 27$	<b>- 0,28, **</b> $\Delta = - 2,2$	n.s.
Antibiotika (0 - 1)	n.s.	<b>- 0,2, *</b> $\Delta = - 1,9$	n.s.
Immunsuppressiva (0 - 1)	n.s.	n.s.	n.s.
Antikoagulantien (0 - 1)	n.s.	n.s.	n.s.
Protonenpumpeninhibitoren (0 - 1)	n.s.	<b>- 0,21, *</b> $\Delta = - 1$	n.s.
Antidiabetika / Insulin (0 - 1)	<b>- 0,23, *</b> $\Delta = - 14$	<b>- 0,26, **</b> $\Delta = - 1,4$	n.s.
Phosphatbinder (0 - 1)	<b>- 0,29, **</b> $\Delta = - 27$	n.s.	n.s.
Vitamin D (0 - 1)	<b>- 0,3, ***</b> $\Delta = - 15$	n.s.	<b>0,18, *</b> $\Delta = 0,16$
Bikarbonat (0 - 1)	<b>- 0,39, ***</b> $\Delta = - 26$	<b>- 0,25, **</b> $\Delta = - 1,4$	<b>0,26, **</b> $\Delta = 0,3$
Thyroxin (0 - 1)	n.s.	n.s.	n.s.
Antidepressiva / Antipsychotika (0 - 1)	n.s.	n.s.	n.s.
Cholesterinsenker (0 - 1)	<b>- 0,31, ***</b> $\Delta = - 16$	<b>- 0,23, *</b> $\Delta = - 1$	n.s.

Abkürzungen: eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), Hb (Hämoglobin), CKD (chronische Nierenkrankheit), w (weiblich), m (männlich), RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron System)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); 0 = nein; 1 = ja,  $\Delta$  = Differenz; Pearson-Korrelationstest: Korrelationskoeffizient  $r$ ; Differenz der Mittelwerte; n.s. nicht signifikant  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die eGFR korrelierte in der Gesamtkohorte signifikant negativ mit dem Alter der Personen, dem P-Kreatinin, dem P-Cystatin C, dem P-CRP, dem P-EPO und der LDH. Sie korrelierte positiv mit dem Hämatokrit und der Erythrozytenzahl (Tab. 22). Bei den CKD-Patienten fand sich zusätzlich eine signifikant negative Korrelation mit dem MCV und eine signifikant positive Korrelation mit der MCHC, die negative Korrelation mit dem P-CRP und P-EPO waren hier nicht signifikant. Die Hb-Konzentration korrelierte in der Gesamtkohorte und bei den CKD-Patienten signifikant positiv mit dem Hämatokrit, der Erythrozytenzahl, der MCHC und dem SU-Kreatinin und negativ mit dem P-Kreatinin, dem P-Cystatin C, dem P-CPR und dem P-EPO (Tab. 22). Für die Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen) fand sich in der Gesamtkohorte eine univariat signifikant positive Korrelation mit dem Alter der Studienteilnehmer, dem P-Kreatinin und dem P-Cystatin C und eine negative Korrelation mit dem Hämatokrit und der Erythrozytenzahl. Bei den CKD-Patienten fanden sich diese Korrelationen ebenso, nur das Alter der Patienten war nicht signifikant mit der Eryptoserate korreliert (Tab. 22).

**Tab. 22: Univariate Korrelationen von eGFR, Hb und Eryptoserate mit demographischen und klinischen Variablen und Laborparametern aus Vollblut (VB), Plasma (P) und Spontanurin (SU) in der Gesamtkohorte und bei den CKD-Patienten**

<i>Parameter</i>	<b>eGFR</b> (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	<b>Hämoglobin</b> (g/dl)	<b>Annexin V- Bindung (%)</b>
<i>Alter (Jahre)</i>	- <b>0,44, ***</b> (255)	- 0,11, n.s. (247)	<b>0,14, *</b> (255)
	- <b>0,33, ***</b> (122)	- 0,12, n.s. (114)	0, n.s. (122)
<i>Body-Mass-Index (BMI) (kg/m<sup>2</sup>)</i>	x	x	x
	- 0,18, n.s. (81)	0,01, n.s. (78)	- 0,12, n.s. (81)
<i>Kreatinin (P, mg/dl)</i>	- <b>0,75, ***</b> (255)	- <b>0,51, ***</b> (247)	<b>0,44, ***</b> (255)
	- <b>0,68, ***</b> (122)	- <b>0,46, ***</b> (114)	<b>0,34, ***</b> (122)
<i>Cystatin C (P, mg/l)</i>	- <b>0,88, ***</b> (255)	- <b>0,6, ***</b> (247)	<b>0,48, ***</b> (255)
	- <b>0,82, ***</b> (122)	- <b>0,59, ***</b> (114)	<b>0,36, ***</b> (122)
<i>Hämatokrit (VB, %)</i>	<b>0,57, ***</b> (247)	<b>0,95, ***</b> (247)	- <b>0,36, ***</b> (247)
	<b>0,46, ***</b> (114)	<b>0,98, ***</b> (114)	- <b>0,31, ***</b> (114)
<i>Erythrozytenzahl (VB, Mio/<math>\mu</math>l)</i>	<b>0,52, ***</b> (247)	<b>0,89, ***</b> (247)	- <b>0,34, ***</b> (247)
	<b>0,50, ***</b> (114)	<b>0,92, ***</b> (114)	- <b>0,34, ***</b> (114)
<i>MCV (VB, fl)</i>	0,02, n.s. (247)	0,03, n.s. (247)	0,03, n.s. (247)
	- <b>0,24, *</b> (114)	- 0,06, n.s. (114)	0,18, n.s. (114)

<i>MCH (VB, pg)</i>	- 0,1, n.s. (175) - 0,03, n.s. (114)	0,07, n.s. (175) 0,11, n.s. (114)	0,09, n.s. (175) 0,13, n.s. (114)
<i>MCHC (VB, g/dl)</i>	- 0,13, n.s. (175) <b>0,37, ***</b> (114)	<b>0,17, *</b> (175) <b>0,37, ***</b> (114)	0,06, n.s. (175) - 0,05, n.s. (114)
<i>C-reaktives Protein (CRP) (P, mg/dl)</i>	- <b>0,17, **</b> (255) - 0,1, n.s. (122)	- <b>0,23, ***</b> (247) - <b>0,2, *</b> (114)	0,08, n.s. (255) 0, n.s. (122)
<i>Erythropoetin (EPO) (P, mU/ml)</i>	- <b>0,17, **</b> (254) - 0,13, n.s. (121)	- <b>0,35, ***</b> (246) - <b>0,36, ***</b> (113)	0,05, n.s. (254) 0, n.s. (121)
<i>Eiweiß (P, g/dl)</i>	x 0, n.s. (85)	x 0,1, n.s. (82)	x - 0,15, n.s. (85)
<i>Albumin (P, g/dl)</i>	x 0,01, n.s. (28)	x 0,1, n.s. (26)	x 0,02, n.s. (28)
<i>Harnsäure (P, mg/dl)</i>	x - 0,22, n.s. (64)	x - 0,11, n.s. (63)	x - 0,09, n.s. (64)
<i>Laktatdehydrogenase (Astor et al.) (P, U/l)</i>	x - <b>0,22, *</b> (105)	x - 0,08, n.s. (101)	x 0, n.s. (105)
<i>Kreatinin (SU, mg/dl)</i>	x 0,17, n.s. (117)	x <b>0,26 **</b> (109)	x - 0,02, n.s. (117)
<i>Proteinurie (SU, mg/g Kreatinin)</i>	x - 0,07, n.s. (117)	x 0,06, n.s. (109)	x 0,01, n.s. (117)
<i>Albuminurie (SU, mg/g Kreatinin)</i>	x - 0,14, n.s. (117)	x - 0,07, n.s. (109)	x 0,12, n.s. (117)

Abkürzungen: eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), Hb (Hämoglobin), CKD (chronische Nierenkrankheit), MCV (mittleres Erythrozyteneinzelvolumen), MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin), MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); Pearson-Korrelationstest; Gesamtkohorte: Korrelationskoeffizient  $r$ , Signifikanz ( $n$ ), CKD-Patienten: Korrelationskoeffizient  $r$ , Signifikanz ( $n$ ); n.s., nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ;

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.7 Calcium-, ROS- und Ceramid-Bestimmung der Erythrozyten

Die relative geoMFI der intrazellulären Calcium-Konzentration der Patienten unterschied sich nicht signifikant von der geoMFI der Kontrollgruppe (Md = 19,62 (IQR = 6,09) in der CKD- und 20,03 (0,24) in der Kontrollgruppe,  $p \geq 0,05$ , siehe Tab. 23). Auch die relative geoMFI der ROS der Patienten war in dieser Kohorte nicht signifikant erhöht (15,21 (4,4) und 14,91 (0,21),  $p \geq 0,05$ , siehe Tab. 23). Bei der Ceramid-Bestimmung fand sich dagegen eine leicht erhöhte Ceramid-Konzentration in der Patienten- (15,54 (2,61)) im Vergleich zur Kontrollgruppe (15 (0,19),  $p = 0,002$ , siehe Tab. 23). Es fand sich eine signifikant negative Korrelation zwischen der relativen geoMFI der intrazellulären Calcium-Konzentration und der Hb-Konzentration der Patienten ( $r = -0,22$ ,  $p = 0,021$ , siehe Tab. 23). Die relative geoMFI der intrazellulären Calcium-Konzentration der Patienten korrelierte außerdem signifikant positiv mit der Annexin V-Bindung ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,018$ , Tab. 23). Die relative geoMFI der ROS der Patienten korrelierte signifikant negativ mit der eGFR der Patienten ( $r = -0,2$ ,  $p = 0,028$ , siehe Tab. 23).

**Tab. 23: Univariate Korrelationen von Calcium, ROS und Ceramid mit der eGFR, der Hb-Konzentration und der Eryptoserate bei den CKD-Patienten**

<b>Parameter</b>	<b>eGFR (ml/min/ 1,73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	<b>Annexin V- Bindung (%)</b>
<i>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>- Konzentration (geoMFI)</i>	- 0,15, n.s. (122)	- <b>0,22, *</b> (114)	<b>0,21, *</b> (122)
<i>ROS (geoMFI)</i>	- <b>0,2, *</b> (122)	- 0,1, n.s. (114)	0,09, n.s. (122)
<i>Ceramid (geoMFI)</i>	- 0,04, n.s. (122)	0,08, n.s. (114)	0,12, n.s. (122)

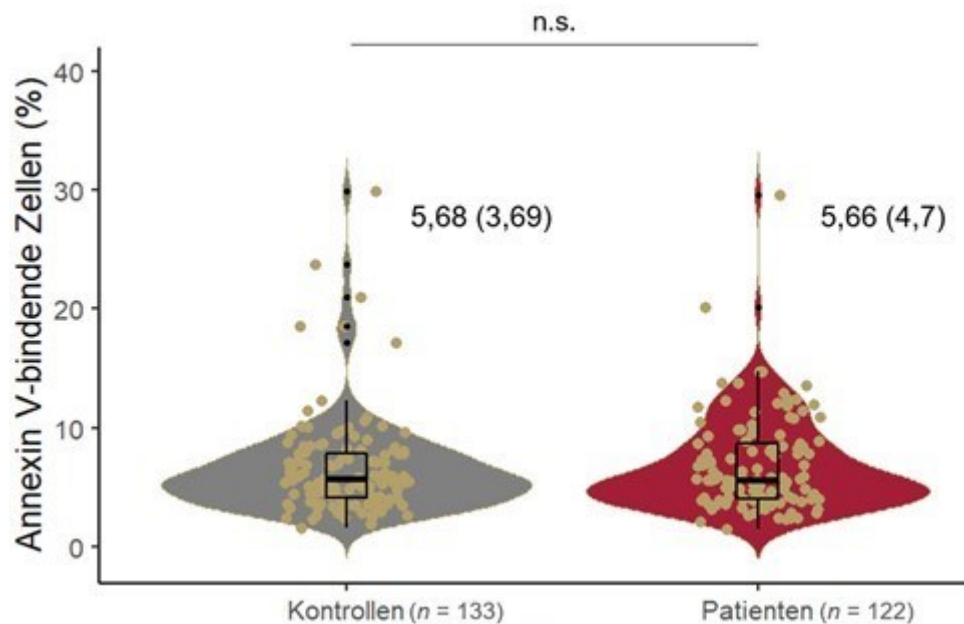
*Abkürzungen: ROS (reaktive Sauerstoffspezies), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), CKD (chronische Nierenkrankheit), Ca<sup>2+</sup> (Calcium), geoMFI (mittlere Fluoreszenzintensität)*

*Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel); Intervallskalierte Variablen: Pearson-Korrelationstest: Korrelationskoeffizient  $r$ , Signifikanz ( $n$ ); n.s., nicht signifikant,  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ .*

### 3.8 FACS-Parameter der im Plasma inkubierten Kontroll-Erythrozyten

Bei der nach 24 h erfolgten Analyse der inkubierten Erythrozyten zeigten sich deutlich erhöhte Eryptoseraten im Vergleich zum Vortag - sowohl bei den im Patientenplasma als auch bei den im Plasma der Kontrollpersonen inkubierten Erythrozyten. Allerdings unterschied sich die Eryptoserate der beiden Gruppen nicht (Md = 5,66 (IQR = 4,7) % Annexin V-bindende Zellen im Patientenplasma und 5,68 (3,69) % im Plasma der Kontrollpersonen,  $p \geq 0,05$ , siehe Abb. 17).

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration der Erythrozyten im Patientenplasma unterschied sich nicht signifikant von den im Kontrollplasma inkubierten Erythrozyten (19 (3,52) und 19,94 (0,37),  $p < 0,05$ ). Auch bei der geoMFI von ROS und Ceramid fand sich kein Unterschied (ROS der CKD-Patienten bei 15,3 (4,52), Ceramid bei 15,13 (3,08); bei den Kontrollpersonen 15,02 (0,27) für ROS und 15,02 (0,2) für Ceramid).



**Abb. 17: Gruppenvergleich der Eryptoserate der für 24 h im Plasma der Kontrollpersonen und Patienten inkubierten Kontroll-Erythrozyten**

Angaben:  $n$  = Personenanzahl; Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variable: Mann-Whitney-U-Test, Median (Interquartilsabstand). n.s.  $p \geq 0,05$ . Eigene Abbildung, erstellt mit R, RStudio und Microsoft PowerPoint.

### 3.9 Aufstellen eines Vorhersagemodells für die Eryptoserate

Mithilfe einer multiplen linearen Regressionsanalyse wurde in der Gesamtkohorte für den dekadischen Logarithmus der Eryptoserate (Annexin V-bindende Zellen) ein Vorhersagemodell aufgestellt (siehe Absatz 2.7.4). Dabei wurden 246 Personen eingeschlossen (113 CKD-Patienten und 133 Kontrollpersonen). Von neun CKD-Patienten waren nicht alle Parameter bekannt (bei  $n = 8$  keine Hb-Konzentration und kein MCV bekannt, bei  $n = 1$  kein P-EPO), weshalb diese für die Analyse ausgeschlossen wurden. Von allen in die schrittweise Analyse miteinbezogenen Parametern ging nur die eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel) in das Vorhersagemodell ein (siehe Tab. 24). Das Modell hatte mit einem  $r^2 = 0,22$  (korrigiertes  $r^2 = 0,21$ ) nach Cohen eine mittlere Anpassungsgüte (Cohen, 1988). Die Prädiktorvariable eGFR sagte statistisch signifikant die Kriteriumsvariable  $\text{Log}_{10}$ Eryptoserate (Annexin V-Bindung in %) voraus,  $F(1, 244) = 67,4$ ,  $p < 0,001$ .

**Tab. 24: Modell "schrittweises Anpassen" für die Eryptoserate, Kriteriumsvariable dekadischer Logarithmus der Eryptoserate, Annexin V-bindende Zellen in % ( $r^2 = 0,22$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 246$ ).**

Kovariablen	Std. $\beta \pm SE$	p-Wert	$r^2$ (korrigiertes $r^2$ )
(Konstante)	$0 \pm 0,054$	$< 0,001$	
eGFR (ml/min/ 1,73m <sup>2</sup> )	$- 0,465 \pm 0,001$	$< 0,001$	0,22 (0,21)

Abkürzungen: Std.  $\beta$  (Standardisierter Schätzer, Betafaktor), SE (engl.: standard error, Standardfehler), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C Formel);  $r^2 =$  multipler Determinationskoeffizient / Bestimmtheitsmaß,  $0,13 \leq r^2 < 0,26 =$  mittlere Anpassungsgüte (Cohen, 1988).

Im Rahmen der Untersuchung auf einen möglichen Konfundierungseffekt wurde keine der verwendeten Arzneimittelgruppen oder der Komorbiditäten in das Modell miteingeschlossen.

Alle in Absatz 2.7.4 aufgeführten Methoden wurden kombiniert eingesetzt, um Ausreißer zu identifizieren. Kontrollperson 90 wurde mithilfe von standardisierten Residuen und studentisierten ausgeschlossenen Residuen als möglicher Ausreißer identifiziert. Bei der Untersuchung der Hebelwerte und Cook-Distanzen

fanden sich hingegen keine Ausreißer, weshalb keine Personen von der Analyse ausgeschlossen wurden. Durch Untersuchung von VIF und Toleranz fand sich keine Multikollinearität. Bei unklarer Homoskedastizität wurde die Analyse mithilfe einer gewichteten Methode (siehe Absatz 2.7.4) wiederholt, wobei erneut nur die eGFR als Koeffizient in das Modell einging ( $r^2 = 0,23$ , korrigiertes  $r^2 = 0,22$ ). Bei visueller Betrachtung von Histogramm und P-P-Diagramm schien eine Normalverteilung der Residuen gegeben zu sein, im Kolmogorov-Smirnov-Test fand sich eine Normalverteilung ( $p = 0,2$ ), im Shapiro-Wilk-Test dagegen war das Ergebnis signifikant ( $p = 0,041$ ). Es konnte also nicht eindeutig von einer Normalverteilung der Residuen ausgegangen werden.

### **3.10 Folgeuntersuchung der univariaten Korrelation zwischen der Eryptoserate und der Veränderung der Hb-Konzentration und der eGFR**

Nach mindestens einem halben Jahr und höchstens einem Jahr ( $\geq 182$  bis  $\leq 365$  Tage) stellten sich 82 Patienten erneut im Universitätsklinikum Tübingen vor (40 Patienten waren ‚der Nachbeobachtung verloren gegangen‘ (engl.: lost to follow-up)). Ausschlusskriterien der Folgeuntersuchungen waren klinisch relevante Blutungen oder die erfolgte Gabe von Erythrozytenkonzentraten ( $n = 2$ ), eine Schwangerschaft mit damit einhergehendem Hb-Abfall ( $n = 2$ ) und ein Dialysebeginn vor der Wiedervorstellung ( $n = 7$ ). Nach erfolgreichem Ausschluss wurden 71 Patienten (39 m, 32 w) eingeschlossen. Der mediane Zeitpunkt der Wiedervorstellung der eingeschlossenen Patienten betrug 242 (105) Tage nach dem Messzeitpunkt.

Bei sieben Patienten war die Hb-Konzentration am Messzeitpunkt nicht bekannt, weshalb diese bei der Hb- und Subgruppenanalyse nicht miteinbezogen werden konnten.

Bei der Wiedervorstellung betrug die Hb-Konzentration  $12,8 \pm 2,1$  (M  $\pm$  SD) g/dl ( $\Delta$  Hb  $0,1 \pm 1,3$  g/dl) und unterschied sich damit nicht signifikant von der Hb-Konzentration zum Messzeitpunkt ( $12,7 \pm 1,9$  g/dl,  $p > 0,05$ ). Die mediane eGFR war mit 42 (34) ml/min/1,73m<sup>2</sup> ( $\Delta$  eGFR 2 (9) ml/min/1,73m<sup>2</sup>; G1:  $n = 6$ , G2:  $n = 14$ ;

G3a:  $n = 13$ , G3b:  $n = 19$ ; G4:  $n = 16$ ; G5:  $n = 3$ ), nicht signifikant niedriger als die eGFR zum Messzeitpunkt ( $p > 0,05$ , siehe Tab. 25).

**Tab. 25: Parameter der Kohorte der Folgeuntersuchung zum Messzeitpunkt und bei der Wiedervorstellung**

Parameter	Kohorte der Folgeuntersuchung ( $n = 71$ )		p-Wert
	Messung	Wiedervorstellung	
Geschlecht (w, m) <sup>1</sup>	32 w (45 %), 39 m (55 %),		
Alter (Jahre) <sup>3</sup>	56 (27)	57 (27)	
Hämoglobin (g/dl) <sup>2</sup>	12,7 ± 1,9 ( $n = 64$ )	12,8 ± 2,1	0,7547
eGFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	43 (30)	42 (34)	0,2718
Annexin V-Bindung (%) <sup>3</sup>	1,08 (0,55)		

Abkürzungen: w (weiblich), m (männlich), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin Formel); Angabe <sup>1</sup>: nominale Variable: Absolute Anzahl (Anteil in %, gerundet auf ganze Zahlen), Chi-Quadrat-Test; Angabe <sup>2</sup>: intervallskalierte, normalverteilte Variable: Mittelwert ± Standardabweichung, zweiseitiger ungerichteter t-Test für abhängige Stichproben; Angabe <sup>3</sup>: intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand), Mann-Whitney-U-Test für abhängige Stichproben.  $p \geq 0,05 =$  nicht signifikant. Personenanzahl  $n = 71$ , außer anders angegeben.

Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen  $\Delta$  Hb und  $\Delta$  eGFR ( $r = -0,12$ ,  $p \geq 0,05$ ), Eryptoserate und  $\Delta$  Hb ( $r = -0,03$ ,  $p \geq 0,05$ ) und Eryptoserate und  $\Delta$  eGFR ( $r = -0,01$ ,  $p \geq 0,05$ ). Eine Eisentherapie erhielten zum Zeitpunkt der Wiedervorstellung 17 Patienten, sieben Patienten erhielten eine Therapie mit ESAs (vergleichend bekamen bei Messzeitpunkt  $n = 12$  der Folgeuntersuchungskohorte eine Eisentherapie,  $n = 7$  eine ESA-Therapie).  $\Delta$  Hb,  $\Delta$  eGFR und Eryptoserate unterschieden sich bei Patienten mit oder ohne Eisentherapie nicht signifikant. Bei Patienten mit ESA-Therapie fand sich eine höhere mediane  $\Delta$  eGFR (12 (14) ml/min/1,73m<sup>2</sup> und 0 (9) ml/min/1,73m<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ , \*) als bei Patienten ohne diese Therapie,  $\Delta$  Hb und Eryptoserate unterschieden sich auch hier nicht signifikant im Vergleich zu Patienten ohne diese Medikation.

Anschließend wurden die Subgruppen differenziert ausgewertet (siehe Absatz 2.7.5). Subgruppe 1 bestand aus 29 (13 m, 16 w), Subgruppe 2 aus 35 (21 m, 14 w) Patienten (für Gruppenvergleiche der Subgruppen siehe Tab. 26). Seit der Messung hatte die eGFR in beiden Subgruppen leicht zugenommen (ohne signifikanten Gruppenunterschied), die Hb-Konzentration war (aufgrund der Einteilung) in Subgruppe 1 gefallen, in Subgruppe 2 angestiegen, dabei unterschied sich jedoch die Eryptoserate der beiden Subgruppen zum Messzeitpunkt nicht. In Subgruppe 1 korrelierten  $\Delta$  Hb und  $\Delta$  eGFR signifikant negativ ( $r = -0,45$ ,  $p < 0,05$ ), zwischen Eryptoserate und  $\Delta$  Hb ( $r = -0,14$ ,  $p \geq 0,05$ ) und Eryptoserate und  $\Delta$  eGFR ( $r = 0,02$ ,  $p \geq 0,05$ ) fanden sich keine signifikanten Korrelationen. Subgruppe 2 wies weder bei  $\Delta$  Hb und  $\Delta$  eGFR ( $r = 0,19$ ,  $p \geq 0,05$ ) noch bei Eryptoserate und  $\Delta$  Hb ( $r = 0$ ,  $p \geq 0,05$ ) oder Eryptoserate und  $\Delta$  eGFR ( $r = 0,03$ ,  $p \geq 0,05$ ) signifikante Korrelationen auf.

**Tab. 26: Gruppenvergleiche der demographischen und laborchemischen Parameter der Subgruppen der Folgeuntersuchung**

<i>Parameter</i>	<b>Subgruppe 1 (n = 29)</b>	<b>Subgruppe 2 (n = 35)</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Geschlecht (w, m)</i> <sup>1</sup>	16 w (55 %), 13 m (45 %)	14 w (40 %), 21 m (60 %)	<b>0,5855</b>
<i>Alter (Jahre), bei Wiedervorstellung</i> <sup>2</sup>	54 ± 18	58 ± 16	0,2998
<i>Zeitpunkt der Wiedervorstellung (Tage)</i> <sup>3</sup>	240 (112)	241 (90)	0,4828
<i>Hämoglobin (g/dl), bei Wiedervorstellung</i> <sup>2</sup>	12,1 ± 2,5	13,3 ± 1,8	<b>0,0486</b>
<i>eGFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>), bei Wiedervorstellung</i> <sup>3</sup>	45 (33)	35 (32)	0,0554
<i>Annexin V-Bindung (%)</i> <sup>3</sup>	1,11 (0,44)	1,09 (0,58)	0,7462
$\Delta$ <i>Hämoglobin (g/dl)</i> <sup>3</sup>	- 0,7 (1)	0,7 (1,3)	<b>&lt; 0,001</b>
$\Delta$ <i>eGFR (ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</i> <sup>3</sup>	2 (9)	2 (7)	0,5983

Abkürzungen: w (weiblich), m (männlich), eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)

Angaben: eGFR (CKD-EPI Kreatinin Formel);  $\Delta$  = Differenz; Subgruppe 1:  $\Delta$  Hb < 0 g/dl, Subgruppe 2:  $\Delta$  Hb  $\geq$  0 g/dl; Angabe <sup>1</sup>: nominale Variable: Absolute Anzahl (Anteil in %, gerundet auf ganze Zahlen), Chi-Quadrat-Test, hier ist  $p > 0,05$  signifikant;

---

*Angabe <sup>2</sup>: intervallskalierte, normalverteilte Variablen: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, zweiseitiger ungerichteter t-Test für unabhängige Stichproben; Angabe <sup>3</sup>: intervallskalierte, nicht-normalverteilte Variablen: Median (Interquartilsabstand), Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben.  $p \geq 0,05$  = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .*

---

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Retikulozytenzahl zum Messzeitpunkt und die  $\Delta$  Hb-Konzentration in der Kohorte der Folgeuntersuchung und den Subgruppen signifikant korrelierten. Dabei fand sich in der Kohorte der Folgeuntersuchung ( $r = -0,18$ ,  $p \geq 0,05$ ) und Subgruppe 2 ( $r = 0,06$ ,  $p \geq 0,05$ ) keine signifikante Korrelation, während Subgruppe 1 eine signifikant negative Korrelation zwischen der Retikulozytenzahl und  $\Delta$  Hb aufwies ( $r = -0,62$ ,  $p < 0,001$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Eryptoserate

In vorangehenden Studien zeigte sich bei dialysepflichtigen CKD-Patienten eine vermehrte Eryptoserate im Sinne einer gesteigerten Phosphatidylserin-Exposition auf der Erythrozytenoberfläche (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Lang et al., 2017, Dias et al., 2018). Gok et al. berichteten kürzlich auch bei 59 nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten der Stadien G3 bis G5 von einer erhöhten Eryptoserate (Gok et al., 2022).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich auch bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, nicht-dialysepflichtigen Patientenkohorte aller CKD-Stadien eine gesteigerte Eryptoserate fand (vgl. Abschnitt 3.5). Dabei war die Eryptoserate bei den CKD-Patienten nahezu 1,4-mal so hoch wie bei den Kontrollpersonen (veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024)). Bei Dialysepatienten wurde diese in den oben genannten Studien als doppelt so hoch beschrieben (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016). Durch das schnelle Entfernen der Phosphatidylserin-exponierenden Erythrozyten aus der Blutbahn (Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Larsson et al., 2016) wurde dieser Verdopplung der Eryptoserate im Vergleich zu den Kontrollpersonen bei gleichbleibender Erythropoese eine theoretische Reduktion der Erythrozyten-Lebenszeit auf die Hälfte zugeschrieben (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016). Folglich sollte auch die in dieser Studie festgestellte, erhöhte Eryptoserate eine deutlich reduzierte Erythrozyten-Lebensdauer bedingen, welche in beträchtlichem Maße zur Anämie der Patienten beiträgt. Diese verstärkte Eryptose könnte außerdem die trotz adäquater exogener Erythropoetin-Zufuhr persistierende Anämie erklären (Bissinger et al., 2016).

Die Eryptoserate der im Rahmen dieser Studie untersuchten CKD-Patienten stieg mit zunehmendem CKD-Stadium an (vgl. Abschnitt 3.5). Die zunehmende Eryptoserate bei Reduktion der Nierenfunktion könnte erklären, warum die Eryptose in Studien mit dialysepflichtigen Patienten im Vergleich stärker ausgeprägt war (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016) als in der im Rahmen dieser Studie

untersuchten Patientenkohorte. Außerdem könnte bei dialysepflichtigen Patienten auch das Dialysat eine verstärkte Eryptose bedingen (Bissinger, 2016).

In der Studie von Abed et al. zur Eryptose bei dialysepflichtigen CKD-Patienten wurde die Eryptose von einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration, vermehrtem oxidativem Stress und einer verstärkten Ceramid-Bildung begleitet (Abed et al., 2014), welche, wie in Absatz 1.3.1 erläutert, bekannte Auslöser der Eryptose darstellen (Lang et al., 2012, Lang et al., 2017, Bissinger et al., 2019, Dias et al., 2020). In der im Rahmen dieser Studie untersuchten Patientenkohorte fand sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Ceramid-Konzentration und bei den Patienten waren tendenziell mehr reaktive Sauerstoffspezies vorhanden als bei den Kontrollpersonen, wobei dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant war (vgl. Abschnitt 3.7). Außerdem ließ sich eine univariant signifikant negative Korrelation der reaktiven Sauerstoffspezies mit der eGFR nachweisen, was der durch Terawaki et al. beschriebenen Zunahme des oxidativen Stresses mit abnehmender Nierenfunktion entspricht (Terawaki et al., 2004). Dagegen fand sich keine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration bei den CKD-Patienten (veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024)). Allerdings korrelierte die intrazelluläre Calcium-Konzentration signifikant negativ mit der Hb-Konzentration der Patienten, weshalb vermutet werden kann, dass bei einem größeren Patientenanteil mit niedrigerer Hb-Konzentration eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet werden könnte. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Patientenkohorte bei Abed et al. eine  $> 2$  g/dl niedrigere Hb-Konzentration aufwies als die hier beschriebene Patientenkohorte (vgl. Abschnitt 3.3) (Abed et al., 2014). In der Metaanalyse von Pretorius et al. schlussfolgerten die Autoren, dass die Bestimmung der Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin wahrscheinlich die Methode darstellt, die eine Eryptose am besten bestätigt (Pretorius et al., 2016).

Bissinger et al. und Abed et al. beschrieben eine erhöhte Phosphatidylserin-Exposition bei gesunden Kontrollerythrozyten nach 24-stündiger *in vitro* Inkubation in Patientenplasma von dialysepflichtigen CKD-Patienten im Vergleich zu in Plasma von Kontrollpersonen inkubierten Erythrozyten. Deshalb stellten sie die

Vermutung auf, dass urämische Plasmabestandteile bei CKD-Patienten als Eryptose-Auslöser fungieren könnten (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016). Dazu könnten beispielsweise folgende bereits beschriebene Eryptose-stimulierende, urämische Toxine zählen: Vanadat (Föller et al., 2008), Acrolein (Ahmed et al., 2013b), Methylglyoxal (Nicolay et al., 2006), Indoxylsulfat (Ahmed et al., 2013a), Indol-3-Essigsäure (Gao et al., 2015) und erhöhtes extrazelluläres Phosphat (Voelkl et al., 2013, Lang et al., 2017, Qadri et al., 2017). Bisher ist allerdings unklar, zu welchem Grad die einzelnen urämischen Toxine zur Eryptose beitragen. Zudem könnten weitere Substanzen als Auslöser der Eryptose im Plasma der CKD-Patienten fungieren. Die Eryptose könnte zusätzlich durch verschiedene Xenobiotika ausgelöst werden (Abed et al., 2014, Lang und Lang, 2015a, Bissinger et al., 2016).

Auch in dieser Studie wurde die Phosphatidylserin-Exposition von für 24 h in Plasma inkubierten Kontrollerythrozyten untersucht. Dabei fanden sich zwar signifikant erhöhte Eryptoseraten im Vergleich zum Vortag, aber es ließ sich dabei kein Unterschied zwischen den Erythrozyten, die in Patientenplasma und den Erythrozyten, die in Kontrollplasma inkubiert wurden, feststellen (vgl. Abschnitt 3.8) (veröffentlicht am 21.12.2024 in *Kidney International Reports* (Bissinger et al., 2024)). Dies könnte auf eine mit der besseren verbleibenden Nierenfunktion und damit Entgiftungsleistung einhergehenden vergleichsweise geringeren Konzentration an urämischen Toxinen im Plasma der Patienten zurückzuführen sein. Virzì et al. beobachteten bei Peritonealdialyse-Patienten eine mit progressiver eGFR-Reduktion zunehmende Eryptoserate. Die Eryptose bei noch vorhandener Diurese war signifikant niedriger als bei Patienten ohne Diurese. Die Autoren vermuteten dabei ebenfalls, dass dies durch die geringere Konzentration urämischer Toxine bei besserer Nierenfunktion bedingt sein könnte (Virzì et al., 2019). Abed et al. nahmen an, dass diese Plasma-Komponenten durch die Dialyse entfernt oder inaktiviert würden, da sie eine Verringerung des Effekts von urämischem Plasma auf die Kontroll-Erythrozyten nach Hämodialyse beobachteten (Abed et al., 2014). Folglich könnte der Effekt im Plasma der hier untersuchten, nicht-dialysepflichtigen Patientenkohorte eventuell nicht stark genug ausgeprägt gewesen sein.

Wie beschrieben war die Eryptoserate demnach auch bei den hier vorgestellten, nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten signifikant erhöht. Im folgenden Abschnitt soll näher darauf eingegangen werden, welche Korrelationen zwischen der Nierenfunktion, der Anämie sowie der Eryptoserate bestanden.

## 4.2 Nierenfunktion, Anämie und Eryptose

Die eGFR der Patienten korrelierte in der untersuchten Patientenkohorte univariat signifikant positiv mit der Hb-Konzentration (vgl. Abschnitt 3.3). Dies entspricht der durch KDIGO et al. beschriebenen negativen Korrelation von Inzidenz, Prävalenz und Ausprägung der renalen Anämie mit der eGFR (KDIGO et al., 2012). Die Eryptoserate (Phosphatidylserin-Exposition) der CKD-Patienten korrelierte dagegen univariat signifikant negativ mit der eGFR und der Hb-Konzentration der Patienten (vgl. Abschnitt 3.5). Eine reduzierte Nierenfunktion ging folglich häufig mit einer niedrigeren Hb-Konzentration bis hin zur Anämie und einer stärker ausgeprägten Eryptose einher. Dies unterstützt die Theorie, dass die Eryptoserate bei CKD-Patienten signifikant zur CKD-stadienabhängig steigenden Inzidenz und Prävalenz der Anämie beiträgt. Virzi et al. stellten bei Peritonealdialyse-Patienten ebenfalls eine negative Korrelation der GFR mit der Eryptoserate fest, sie vermuteten, wie bereits beschrieben, einen Zusammenhang mit der GFR-abhängigen Clearance von urämischen Toxinen (Virzi et al., 2019).

Bei der Analyse von demographischen und klinischen Parametern und der Eryptoserate fand sich eine signifikant höhere Eryptoserate nur bei Patienten mit Einnahme von Vitamin D und Bikarbonat. Die Eryptoserate korrelierte univariat positiv mit dem P-Kreatinin und dem P-Cystatin C. Eine univariat signifikant negative Korrelation fand sich dagegen, neben der Hb-Konzentration und der eGFR, mit dem Hämatokrit und der Erythrozytenzahl. In der Gesamtkohorte ergab sich außerdem eine signifikant positive Korrelation mit dem Alter der Studienteilnehmer und dem P-Ferritin und eine signifikant negative Korrelation mit dem P-Eisen und dem P-Transferrin (vgl. Abschnitt 3.6). Die signifikant erhöhte Eryptoserate bei Vitamin D- und Bikarbonat-Einnahme der Patienten könnte durch den CKD-stadienabhängigen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz der damit therapierten metabolischen Azidose und des Vitamin-D-Mangels bedingt sein (KDIGO, 2013,

Herold, 2023). Durch die negative Korrelation der Eryptoserate mit der eGFR könnte dadurch auch der signifikante Unterschied der Eryptoserate bei Patienten mit Vitamin D- und Bikarbonat-Einnahme im Vergleich zu Patienten ohne diese Einnahme erklärt werden. Definitionsgemäß nehmen P-Kreatinin und P-Cystatin C mit Abnahme der eGFR zu, wodurch sich die positive Korrelation mit der Eryptoserate erklären lässt. Die positive Korrelation der Eryptoserate mit dem Alter der Studienteilnehmer ist vermutlich durch die altersabhängige Abnahme der Nierenfunktion bedingt (KDIGO, 2013). Dazu passend fand sich eine negative Korrelation zwischen Alter und eGFR. In der von Virzì et al. untersuchten dialysepflichtigen Patientenkohorte unterschieden sich Patienten mit oder ohne Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen ebenfalls nicht signifikant bezüglich der Eryptoserate (Virzì et al., 2019). Auf die Zusammenhänge zwischen Eryptoserate und Eisenstatus-Parametern wird in Abschnitt 4.3 genauer eingegangen.

Die eGFR setzte sich in der multiplen Regressionsanalyse der Eryptoserate der Gesamtkohorte gegenüber den übrigen untersuchten Prädiktorvariablen durch und sagte statistisch signifikant den dekadischen Logarithmus der Annexin V-Bindung voraus (vgl. Abschnitt 3.9). Dies weist daraufhin, dass die Nierenfunktion die wichtigste unabhängige Determinante der Eryptoserate darstellen könnte.

Die Verletzung der Normalverteilung ist dabei bei Datensätzen, bei denen eine  $n$  - Zahl der einzelnen Variablen  $> 10$  gegeben ist, vernachlässigbar, da die multiple lineare Regressionsanalyse hierbei als robust gegenüber der Verletzung der Normalverteilung betrachtet werden kann (Schmidt und Finan, 2018).

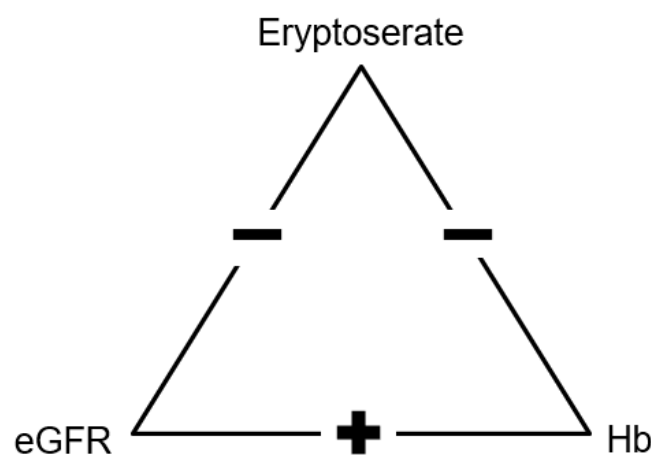
In der untersuchten Patientenkohorte hatten CKD-Patienten mit den Komorbiditäten Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen (außer arterieller Hypertonie) oder der Einnahme von Betablockern, Eisen, Erythropoese-stimulierenden Substanzen (ESAs), Antidiabetika oder Insulin, Phosphatbindern, Vitamin D, Bikarbonat oder Cholesterinsenkern eine niedrigere eGFR und damit eine schlechtere Nierenfunktion im Vergleich zu Patienten ohne diese Merkmale. Außerdem korrelierte die eGFR der Patienten signifikant positiv mit dem Hämoglobin, dem Hämatokrit, der Erythrozytenzahl, der MCHC, der Transferrin-

Sättigung, dem P-Eisen und dem P-Transferrin. Dagegen fand sich eine signifikant negative Korrelation mit dem Alter der Patienten, der Eryptoserate, dem MCV, dem P-Kreatinin, dem P-Cystatin C und der LDH. In der Gesamtkohorte fand sich außerdem eine signifikant negative Korrelation mit dem P-CRP, dem P-Ferritin und dem P-Erythropoetin (vgl. Abschnitt 3.6). Die Zusammenhänge zwischen den genannten Komorbiditäten, der Medikamenteneinnahme und der Nierenfunktion der Patienten könnten durch die CKD-stadienabhängige häufigere Notwendigkeit der Therapie der Komplikationen der CKD bedingt sein. Die Inzidenz und Prävalenz dieser Komplikationen nimmt mit Abnahme der Nierenfunktion zu. Es kommt stadienabhängig unter anderem vermehrt zu Störungen der Blutdruckregulation (arterielle Hypertonie), Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels (Vitamin-D-Mangel und Hyperphosphatämie) und kardiovaskulären Komplikationen (KDIGO, 2013, Herold, 2023). Das Alter der Patienten, eine Hyperglykämie und Dyslipidämie der Patienten gehören außerdem zu den von der KDIGO beschriebenen, mit einer stärkeren Progression der CKD assoziierten, Faktoren (KDIGO, 2013). Diese Beobachtung ist mit der in dieser Studie festgestellten schlechteren Nierenfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus, Patienten mit Einnahme von Antidiabetika und Cholesterinsenkern und mit der negativen Korrelation der eGFR mit dem Alter der Patienten vereinbar. Die positive Korrelation der eGFR mit dem P-Transferrin und die negative Korrelation mit dem P-Ferritin und P-CRP könnte über eine Inflammation bei CKD erklärbar sein (siehe dazu Abschnitt 4.3). Die negative Korrelation des Plasma-Erythropoetins mit der eGFR in der Gesamtkohorte könnte über die stark erhöhte EPO-Konzentration bei zehn Patienten der CKD Stadien G3b bis G5 in der Studienkohorte und die positive Korrelation der eGFR mit der Hb-Konzentration erklärbar sein. Patienten mit schlechter Nierenfunktion wiesen niedrigere Hb-Konzentrationen auf und erhielten dadurch häufiger eine ESA-Therapie (siehe Abschnitt 3.4).

Im Rahmen der durchgeführten retrospektiven Folgeuntersuchung fand sich keine signifikante Korrelation zwischen der Eryptoserate zum Messzeitpunkt und  $\Delta$  Hb und  $\Delta$  eGFR. Dabei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in  $\Delta$  eGFR und Eryptoserate der eingeteilten Subgruppen (vgl. Abschnitt 3.10). Folglich konnte die Eryptoserate zum Messzeitpunkt nicht zur Vorhersage der

Veränderungen der Hb-Konzentration in dem Zeitintervall bis zur Folgeuntersuchung genutzt werden. Es kam allerdings generell zu keiner signifikanten medianen Veränderung der Hb-Konzentration und der eGFR der Patientenkohorte im Zeitintervall zwischen dem Messzeitpunkt und der Wiedervorstellung. Es könnte vermutet werden, dass bei der untersuchten Patientenkohorte möglicherweise zum Zeitpunkt der Messung median bereits ein Gleichgewicht zwischen Erythropoese und Eryptose herrschte. Eine weitere Diskussion dieses Ergebnisses findet sich in Abschnitt 4.5.

Zusammenfassend trat eine gesteigerte Eryptose bereits bei nicht-dialysepflichtiger chronischer Nierenkrankheit auf und korrelierte signifikant negativ mit der eGFR und der Hb-Konzentration (siehe Abb. 18). Die Eryptoserate könnte folglich signifikant zur renalen Anämie der CKD-Patienten beitragen.



**Abb. 18: Schematische Darstellung der univariaten Korrelationen zwischen Eryptoserate, eGFR und Hb**

*Abkürzungen: eGFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate), Hb (Hämoglobin)  
Angaben: Die Eryptoserate (Phosphatidylserin-Exposition) korrelierte negativ mit der Hb-Konzentration und der eGFR. Die eGFR korrelierte außerdem positiv mit der Hb-Konzentration. Eigene Abbildung, erstellt mit Microsoft PowerPoint.*

### 4.3 Anämie bei chronischer Nierenkrankheit

Wie die vorgestellten Ergebnisse zeigen, wiesen 50 % der im Rahmen dieser Studie untersuchten, nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten eine Anämie auf. Dabei nahm der Prozentanteil anämischer Patienten mit steigendem CKD-

Stadium zu (vgl. Abschnitt 3.3). Allerdings ist anzumerken, dass in Stadium G1 überproportional viele Patienten eine Anämie aufwiesen ( $n = 2$ ), was auf die geringe Patientenzahl in diesem Stadium ( $n = 5$ ) zurückzuführen sein könnte. Es handelte sich um eine normozytäre, normochrome Anämie, was der häufigsten Anämieform bei chronischer Nierenkrankheit entspricht (KDIGO et al., 2012). Patienten mit männlichem Geschlecht oder Einnahme von RAAS-Hemmern hatten eine höhere Hb-Konzentration im Vergleich zu Patienten ohne diese Merkmale. Dagegen hatten Patienten mit Diabetes mellitus oder der Einnahme von Eisen, ESAs, Antibiotika, Protonenpumpeninhibitoren, Antidiabetika, ‚anderen Antihypertensiva‘, Bikarbonat und Cholesterinsenker im Vergleich eine signifikant niedrigere Hb-Konzentration. Die Hb-Konzentration korrelierte univariat positiv mit der eGFR, dem Hämatokrit, der Erythrozytenzahl, der MCHC, der Transferrin-Sättigung, dem P-Eisen und dem SU-Kreatinin. Negativ korrelierte die Hb-Konzentration mit der Erythrozytenrate, dem P-Kreatinin, dem P-Cystatin C, dem P-CRP und dem P-Erythropoetin. In der Gesamtkohorte fand sich zusätzlich eine positive Korrelation der Hb-Konzentration mit dem P-Transferrin (vgl. Abschnitt 3.6).

Bei dem Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Studien fanden sich einige Übereinstimmungen: In einer in Schweden durchgeführten Beobachtungsstudie von CKD-Patienten wurde die Anämie-Prävalenz von 14415 Patienten der CKD-Stadien G3b bis G5 aus dem Schwedischen Nierenregister erhoben ( $n = 11370$  nicht-dialysepflichtige und  $n = 3045$  dialysepflichtige Patienten). Dabei hatten 60 % der nicht-dialysepflichtigen und 93 % der dialysepflichtigen Patienten eine Anämie (Evans et al., 2020). Dies entspricht fast gänzlich der im Rahmen dieser Querschnittsstudie ermittelten Prävalenz der Anämie (CKD-Stadium G3b bis G5: 62 %, vgl. Abschnitt 3.3). Bei einer in Irland durchgeführten multizentrischen Querschnittsstudie wiesen von 530 CKD-Patienten dagegen nur 38 % eine Anämie auf, die Prävalenz der Anämie stieg dabei allerdings ebenfalls CKD-stadienabhängig an (Stack et al., 2017). Auch Inker et al. fanden in ihrer Studienkohorte eine höhere Anämie-Prävalenz bei Patienten mit Diabetes mellitus (Inker et al., 2019). Diese Beobachtung könnte allerdings auch auf die median schlechtere Nierenfunktion der Patienten mit Diabetes mellitus als Komorbidität zurückzuführen sein. Die Zusammenhänge zwischen den genannten Komorbiditäten, der

Medikamenteneinnahme und der Hb-Konzentration der Patienten könnten durch die positive Korrelation der Hb-Konzentration mit der eGFR und die stadienabhängig zunehmenden Komplikationen der CKD bedingt sein (siehe Abschnitt 4.2). Die negative Korrelation der Hb-Konzentration mit dem P-Erythropoetin könnte durch die Hb-abhängige ESA-Therapie der CKD-Patienten erklärt werden.

Bissinger et al. berichteten bei dialysepflichtigen CKD-Patienten mit renaler Anämie im Vergleich zu Kontrollpersonen über signifikant gesteigerte Retikulozytenzahlen, welche mit der Eryptoserate korrelierten (Bissinger et al., 2016). Die Erythropoetin-Level der CKD-Patienten waren im Verhältnis zur Ausprägung der Anämie häufig unzureichend erhöht (Artunc und Rislér, 2007, Babitt und Lin, 2012). Diese Konstellation ließ sich auch in der hier untersuchten, nicht-dialysepflichtigen Patientenkohorte feststellen: die Retikulozytenzahl war signifikant erhöht, die Plasma Erythropoetin-Konzentration wies dagegen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Erhöhung auf (vgl. Abschnitt 3.4). Folglich konnte die Anämie der Patienten nicht ausreichend kompensiert werden. Dies könnte durch eine aus der verringerten Durchblutung des Nierengewebes resultierenden geringeren Aktivierung des HIF-Systems bei CKD bedingt sein, welche zu einer reduzierten EPO-Produktion führt (Wenger und Hoogewijs, 2010). Außerdem wird eine Störung der Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks durch das HIF-System bei CKD mit daraus resultierender verminderter Aktivierung des EPO-Gens beschrieben, welche zur Anämie-Entwicklung beiträgt (Guedes et al., 2020). Der RPI zeigte eine inadäquate Reaktion des Knochenmarks auf die Anämie.

Laut KDIGO et al. ist ein weiterer häufiger, reversibler Grund für die chronische oder progressive Anämie bei CKD eine Eisenmangelanämie (KDIGO et al., 2012). Aus einer Analyse von Daten der National Health and Nutritional Examination Survey zur Eisenmangelanämie bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten in den USA ging hervor, dass niedrige Eisenlevel bei 58 bis 59 % der Männer und bei 70 bis 73 % der Frauen vorkamen (Fishbane et al., 2009). Auch 40 der in dieser Studie untersuchten CKD-Patienten wiesen einen Eisenmangel auf, insgesamt hatten über die Hälfte davon ( $n = 24$ ) eine Eisenmangelanämie (vgl. Absatz 3.5.1). Die Prävalenz der Eisenmangelanämie war CKD-stadienabhängig,

wobei wiederum in Stadium G1 überproportional viele Patienten ( $n = 2$ ) eine Eisenmangelanämie aufwiesen, was auf die geringe Patientenanzahl in diesem Stadium zurückzuführen sein könnte. Die Prävalenz einer Eisenmangelanämie in der Allgemeinbevölkerung in Europa wird dagegen zwischen 1,5 und 3 % angegeben, bei Frauen im gebärfähigen Alter liegt sie bei bis zu 13 % (Zoller, 2021). Folglich war die Prävalenz der Eisenmangelanämie in dieser Patientenkohorte im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht. Dabei war das Plasma-Ferritin allerdings im Vergleich zu den Kontrollpersonen median bei den CKD-Patienten höher. Dies könnte auf die Rolle von Ferritin als positives Akute-Phase-Protein zurückzuführen sein, welches bei Entzündungen erhöht ist (Lipschitz et al., 1974). Gleichzeitig war das Plasma-Transferrin, ein negatives Akute-Phase-Protein, signifikant erniedrigt. Bei CKD-Patienten findet sich häufig eine subklinische Inflammation mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinen (Geddes, 2018). Auch die im Rahmen dieser Studie untersuchte Patientenkohorte wies eine innerhalb der Normwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe median signifikant erhöhte CRP-Konzentration auf (3,5-mal so hoch wie in der Kontrollgruppe). Die Plasma-Eisen-Konzentration war in der Patientenkohorte median signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen. Sowohl die Eisen- als auch die Transferrin-Konzentration waren dabei CKD-stadienabhängig vermindert und korrelierten positiv mit der eGFR und der Hb-Konzentration (P-Transferrin mit der Hb-Konzentration nur in der Gesamtkohorte). In der Gesamtkohorte konnte außerdem eine negative Korrelation zwischen Eisen- und Transferrin-Konzentration und der Erytoserate festgestellt werden. Bei der Transferrin-Sättigung fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen CKD-Patienten und Kontrollpersonen. Das erniedrigte P-Eisen und P-Transferrin, kombiniert mit einer normalen Transferrin-Sättigung und erhöhtem P-Ferritin, deuten darauf hin, dass bei vielen der Patienten ein funktionaler oder kombinierter Eisenmangel statt einem Speichereisenmangel vorliegen könnte. Eine ineffektive Verwendung der Eisenspeicher könnte durch eine retikuloendotheliale Blockade bei vorliegender systemischer Inflammation oder durch erhöhte Hpcidin-Level bedingt sein (Babitt und Lin, 2012, Macdougall et al., 2016, Batchelor et al., 2020). Die Hpcidin-Level wurden in dieser Studie allerdings nicht bestimmt. Im Rahmen einer zukünftigen,

interventionellen Studie wäre eine Untersuchung der Veränderung der Eryptoserate in festgelegten Intervallen nach Eisengabe sinnvoll, um genauere Rückschlüsse auf den Einfluss eines Eisenmangels auf die Eryptoserate ziehen zu können. Die positive Korrelation zwischen der Eryptoserate und dem P-Ferritin (positives Akute-Phase-Protein) und die negative Korrelation der Eryptoserate mit dem P-Transferrin (negatives Akute-Phase-Protein) in dieser Studie (vgl. Absatz 3.5.1) überschnitt sich mit der Beobachtung anderer Studien, dass eine Inflammation die Eryptose stimulieren könnte (Kempe et al., 2007, Fraenkel, 2017, Gok et al., 2022).

Wie bereits in Abschnitt 4.1 und 4.2 beschrieben, wies die in dieser Studie untersuchte, nicht-dialysepflichtige Patientenkohorte außerdem eine signifikant gesteigerte Eryptoserate auf. Die Eryptoserate korrelierte negativ mit der Hb-Konzentration und der eGFR und bedingte eine verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten. Folglich könnte die Eryptose ebenfalls deutlich zur Anämie-Entstehung der Patienten beitragen.

Demnach bestätigte sich im Rahmen dieser Studie die von Macdougall et al. beschriebene multifaktorielle Genese der Anämie bei CKD (Macdougall et al., 2016), wobei neben der progressiven Reduktion der endogenen EPO-Produktion und einem Eisenmangel auch die CKD-stadienabhängig verstärkte Eryptose einen erheblichen Beitrag zur Anämie-Entstehung leisten sollte. Folglich ist es zukünftig wichtig, die Mechanismen der Anämie bei CKD weiter zu untersuchen, die Eryptose vermehrt mit in die Therapieplanung der Anämie bei CKD-Patienten einzu beziehen und auf die Hemmung der Eryptose abzielende Therapieansätze zu entwickeln.

#### **4.4 Anämie bei CKD: Therapeutische Interventionsmöglichkeiten**

Aus dem Studienkollektiv hatten 83 Patienten (71 %) ein sehr hohes Risiko für Mortalität und andere unerwünschte Ereignisse wie ein akutes Nierenversagen, eine Progression der CKD und kardiovaskuläre Ereignisse (vgl. Abschnitt 3.2, Tab. 17) (KDIGO, 2013). Folglich ist eine adäquate Therapie der CKD und ihrer Komplikationen, wovon die renale Anämie eine Komponente darstellt, essenziell,

um die Prognose der Patienten zu verbessern und möglichst eine weitere Progression der Erkrankung zu verhindern.

Eine Eisentherapie soll bei nachgewiesenem Eisenmangel als Initialtherapie der Anämie durchgeführt werden (siehe Absatz 1.2.2) (KDIGO, 2013). Obwohl ein Eisenmangel bei CKD-Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Portolés et al., 2021), erhielten dennoch nur 13 % der untersuchten Patientenkohorte am Messzeitpunkt eine Eisentherapie. Dagegen wiesen 33 % einen Eisenmangel und 21 % eine Eisenmangelanämie auf (vgl. Absatz 3.5.1). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass nicht bei allen Patienten ein Nachweis dieses Eisenmangels erfolgte. Dabei ist davon auszugehen, dass in der Gesamtheit der CKD-Patienten in Deutschland dieser Anteil deutlich größer ist: In einer Erhebung befanden sich nur 16 % in adäquater medizinischer Behandlung (Girndt et al., 2016).

Nur 7 % der untersuchten Patientenkohorte erhielten zum Zeitpunkt der Messung eine Therapie mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen (ESA) (vgl. Abschnitt 3.1). Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass eine ESA-Therapie wegen der mit ihr assoziierten Risiken, unter anderem einer erhöhten Mortalität (Babitt und Lin, 2012), aktuell nur noch bis zu einer Hb-Konzentration von 11,5 g/dl empfohlen wird (siehe Absatz 1.2.2) (KDIGO, 2013). Mehrere Autoren beschreiben eine inhibierende Wirkung von Erythropoetin auf die Eryptose über eine Hemmung der Calcium-permeablen unspezifischen Kationenkanäle (Myssina et al., 2003). Weiterhin wird aber auch eine Förderung der Bildung besonders für die Eryptose sensitiver Erythrozyten durch chronisch erhöhte EPO-Level genannt (Föller et al., 2007, Lang et al., 2012, Lang et al., 2017, Repsold und Joubert, 2018). Das im Rahmen der EPO-Therapie verstärkte Risiko von Thrombosen (Lippi et al., 2010) und die beeinträchtigte Mikrozirkulation könnten durch eine bei erhöhtem Erythrozyten-Umsatz verstärkte Adhäsion der eryptotischen Erythrozyten an die Gefäßwand und an Thrombozyten bedingt sein (Borst et al., 2012, Lang et al., 2012, Lang und Lang, 2015a, Qadri et al., 2017, Lang et al., 2017) und ist zumindest teilweise auf die Interaktion zwischen Phosphatidylserin an der Erythrozyten-Oberfläche und dem CXC-Motiv-Chemokin 16 (CXCL16, oder auch SR-PSOX,

engl.: Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized low density lipoprotein) des Endothels zurückzuführen (Borst et al., 2012). Die Adhäsion der Erythrozyten wiederum beeinträchtigt den Blutfluss (Borst et al., 2012, Lang et al., 2012). Eine gesteigerte Eryptose, unter anderem im Rahmen einer vermehrten EPO-Therapie, könnte damit das ohnehin erhöhte kardiovaskuläre Risiko der CKD-Patienten zusätzlich vergrößern (Palmer et al., 2010). Die unerwünschten Ereignisse während einer hochdosierten EPO-Therapie könnten also zumindest teilweise auf eine vermehrte Eryptose zurückzuführen sein (Lang et al., 2017).

Der Einsatz der neuen Medikamentengruppe der Prolylhydroxylase-Inhibitoren (HIF-PHIs) in der Therapie der Anämie führte in Studien zu einer erhöhten endogenen EPO-Produktion, könnte das relative EPO-Defizit bei CKD ausgleichen (Schödel und Ratcliffe, 2019, Bissinger et al., 2021, Weir, 2021), die Eisenverfügbarkeit verbessern und das Heparin-Level reduzieren (Babitt et al., 2021) und eine mögliche Alternative zur ESA-Therapie darstellen (Schröppel, 2022). Die Auswirkungen dieser Medikamente auf die Eryptose wurden bisher allerdings noch nicht untersucht. Es zeigte sich aber eine längere Lebenszeit der Erythrozyten bei mit HIF-PHIs im Vergleich zu mit ESAs behandelten Hämodialyse-Patienten (Yang et al., 2021).

Die aktuelle Therapie der Anämie bei CKD besteht, wie beschrieben, aus einer Steigerung der Erythropoese durch Eisen- oder EPO / ESA-Therapie, der Anwendung von oralen HIF-PH-Inhibitoren, oder, falls dies nicht ausreicht, aus Bluttransfusionen. Dies führt zwangsläufig zu einer erhöhten Zahl an eryptotischen Erythrozyten. Allerdings ist keine dieser Therapien auf eine Hemmung der vermehrten Eryptose bei CKD ausgerichtet. Es wird folglich zukünftig eine Therapieform benötigt, welche den Ersatz des Erythropoetins mit einer Hemmung der Eryptose kombiniert (Lang et al., 2017), um den Verlust neuer Erythrozyten und die damit verbundenen Konsequenzen, wie Anämie und Mikrozirkulationsstörungen zu mindern. In der Studie von Bissinger et al. benötigten dialysepflichtige CKD-Patienten mit einer stärkeren Phosphatidylserin-Exposition höhere Dosen an Erythropoetin (Bissinger et al., 2016) und auch Dias et al. beschreiben bei ihrer Modellanalyse von CKD-Patienten die Notwendigkeit häufigerer und

hochdosierterer EPO-Gaben bei kürzerer Erythrozyten-Lebenszeit (Dias et al., 2020). Eine mögliche Hemmung der Eryptose bei CKD-Patienten wäre demnach eine vielversprechende ergänzende Therapieoption.

Neben Erythropoetin (Sun et al., 2018) wurden als hemmend auf die Eryptose einwirkende Substanzen bereits Stickstoffmonoxid (Nicolay et al., 2008) und Katecholamine beschrieben (Lang und Lang, 2015b, Lang et al., 2017). Viele weitere Inhibitoren der Eryptose *in vitro* wurden bereits identifiziert: unter anderem L-Carnitin (Sun et al., 2015), Amitriptylin, Furosemid, Glutathion, N-Acetylcystein, Harnstoff, Vitamin E (Lang und Lang, 2015b), Resveratrol (Qadri et al., 2009), Teriflunomid (Zierle et al., 2016), Thymol (Mahmud et al., 2009), Hydroxytyrosol (Officioso et al., 2016), Blebbistatin (Lang et al., 2011), Reversin (Jemaà et al., 2017), Pyrogallol (Liu et al., 2020), Naringin (Shaik et al., 2012), ASP3026 (Al Mamun Bhuyan et al., 2017) und Vitamin C (Mahmud et al., 2010, Shan et al., 2016). Bisher ist aufgrund der Komplexität und der vielen möglichen Auslöser der Eryptose nicht bekannt, ob diese Substanzen eine vermehrte Eryptose bei CKD-Patienten effektiv verhindern könnten. Zukünftig müsste daher die Effektivität dieser Substanzen oder Substanz-Kombinationen bei der Eryptose-Hemmung bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit weiter untersucht werden (Lang et al., 2017, Bissinger et al., 2021).

Außerdem bleibt bisher unklar, ob es bei einer Hemmung der vermehrten Eryptose verstärkt zur Hämolyse kommen würde. Die Eryptose ist, in einem gewissen Rahmen, ein wichtiger Prozess, der die Entfernung defekter Erythrozyten durch Phagozytose bedingt und eine unkontrollierte Hämolyse mit Freisetzung intrazellulären Hämoglobins verhindert (Lang et al., 2012, Briglia et al., 2017, Qadri et al., 2017, Repsold und Joubert, 2018). Dieses könnte sonst durch Ablagerung in den Nierentubuli zu einer akuten Nierenfunktionseinschränkung führen (Repsold und Joubert, 2018, Föller und Lang, 2020). Es müsste folglich weiter untersucht werden, wie die vermehrte Eryptose gehemmt werden könnte, ohne eine verstärkte Hämolyse zu bedingen. Zusätzlich müssten die Eryptose-hemmenden Substanzen spezifisch auf Erythrozyten wirken, um nicht zum Beispiel bei

Krebspatienten die Apoptose von Tumorzellen zu verhindern oder die Effektivität einer zytostatischen Therapie zu mindern (Bissinger et al., 2019).

Aufgrund einer Persistenz der Anämie und der Anämie-assoziierten Symptome bei einem Teil der CKD-Patienten und einer vermehrten Eryptose bei dialysepflichtigen (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016, Lang et al., 2017, Dias et al., 2018) und nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten (vgl. Abschnitt 3.5) wäre eine die Eryptose hemmende Therapie sehr vielversprechend und es gilt deshalb zukünftig, die Mechanismen der Eryptose und die Auswirkungen möglicher antieryptotischer Therapieformen bei CKD-Patienten genauer zu untersuchen.

#### **4.5 Diskussion des Studienaufbaus**

Im Folgenden sollen der Studienaufbau und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gesamtheit der CKD-Patienten kritisch diskutiert und eingeordnet werden.

Die in dieser Studie untersuchte Kohorte bestand aus Patienten einer Universitätsklinik und ist dadurch nicht vollständig repräsentativ für die Gesamtheit der Patienten mit CKD. In Deutschland stellt die vaskuläre hypertensive Nephropathie die häufigste Ätiologie der CKD dar (23 %), welche in der Studienkohorte nur 13 % aller Patienten aufwies. Dagegen war in der Studienkohorte die glomerulonephritische Genese mit 39 % gegenüber 19 % in der Gesamtheit der CKD-Patienten deutlich überrepräsentiert (vgl. Abschnitt 3.2). In der Studienkohorte waren die Komorbiditäten Diabetes mellitus (30 %) und kardiovaskuläre Erkrankungen (40 %, ohne arterielle Hypertonie, vgl. Abschnitt 3.1) dagegen ähnlich häufig vertreten wie in der Gesamtheit der CKD-Patienten in Deutschland (35 % Diabetes mellitus, 32 % kardiovaskuläre Erkrankungen) (Titze et al., 2015).

Zur Bestimmung eines Eisenmangels wurden die durch KDIGO et al. beschriebenen Cut-off-Werte für die Transferrin-Sättigung und die Ferritin-Konzentration verwendet (siehe Absatz 1.2.1) (KDIGO et al., 2012), welche allerdings in einer KDIGO-Konferenz 2019 als nicht mehr reliabel zum Einschätzen des Körpereisenspeichers und einer Eisen-Therapieantwort eingestuft wurden (Babitt et al., 2021). Dadurch könnte, wie in der Studie von Stancu et al. (siehe Absatz 1.2.1), bei einer größeren Anzahl an CKD-Patienten ein Eisenmangel vorgelegen haben als hier angenommen (Stancu et al., 2010). Dieser könnte wiederum die Anämie

der Patienten mitbedingen und die Eryptoserate der Patienten beeinflussen. Allerdings wird weiterhin, mangels Verfügbarkeit besserer Alternativen, der klinische Einsatz dieser Parameter empfohlen (KDIGO et al., 2012).

Weiterhin könnte in zukünftigen Untersuchungen mithilfe eines kombinierten Einsatzes von Annexin V und Propidiumiodid gegebenenfalls noch spezifischer zwischen viablen, eryptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden (McKinnon, 2018), was den Rahmen der vorliegenden Studie allerdings überschritten hätte.

Außerdem wurden die Untersuchungen für die Studie unter bestehender medikamentöser Therapie durchgeführt, wodurch die pathophysiologischen Vorgänge der chronischen Nierenkrankheit beeinflusst wurden. Eine ESA-Therapie erhielten 7 % der CKD-Patienten (vgl. Abschnitt 3.1). Erythropoetin kann, wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, eventuell die Eryptose der Patienten hemmend beeinflussen. Allerdings könnte es außerdem die Bildung besonders für die Eryptose sensitiver Erythrozyten fördern (Repsold und Joubert, 2018). Eine hohe extrazelluläre Phosphatkonzentration gilt als weiterer Auslöser für die Eryptose (Voelkl et al., 2013). Gok et al. beschreiben daher einen möglichen Einfluss einer Phosphatbinder-Therapie auf die Eryptose ihrer Studienkohorte (Gok et al., 2022). Eine Phosphatbinder-Therapie wurde auch von 7 % ( $n = 9$ ) der CKD-Patienten der hier vorgestellten Studie eingenommen. Laborparameter könnten ebenfalls durch die Arzneimitteltherapie beeinflusst worden sein, zum Beispiel durch eine vermehrte Ausscheidung toxischer Substanzen bei durch Diuretikatherapie gesteigerter Diurese. Diese urämischen Plasmabestandteile werden aber unter anderem als Eryptose-Auslöser bei CKD-Patienten diskutiert (Abed et al., 2014, Bissinger et al., 2016). Bei unbehandelten Patienten könnten die Korrelationen und auch die Eryptoserate somit noch stärker ausgeprägt sein. Dennoch zeigten sich signifikante Korrelationen, aus denen sich bereits erwähnte Schlussfolgerungen ziehen lassen.

Die Prävalenz des Eisenmangels beträgt in Europa in der Allgemeinbevölkerung 5 bis 10 % und bei Frauen im gebärfähigen Alter etwa 20 % (Aapro et al., 2017). Bei den Kontrollpersonen in dieser Studie fand sich dagegen bei 36 % ein

Eisenmangel (vgl. Absatz 3.5.1). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch die Rekrutierung der Kontrollpersonen im Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin in Tübingen und die verhältnismäßig häufige Frequenz der Blutspenden in dieser Kohorte bedingt. Regelmäßiges Blutspenden wird als Risikofaktor für einen Eisenmangel angegeben (Zoller, 2021). Diese vergleichsweise hohe Prävalenz des Eisenmangels in der untersuchten Kontrollgruppe könnte allerdings gegebenenfalls Auswirkungen auf die Laborparameter oder die Eryptoserate der Kontrollpersonen gehabt haben.

Die Folgeuntersuchung wurde nur retrospektiv ausgewertet, die Vorstellung der Patienten fand deshalb nicht zu einem bestimmten, festgelegten Zeitpunkt statt. Außerdem wurden nicht bei allen Patienten mögliche neu aufgetretene Komorbiditäten, wie beispielsweise Tumorerkrankungen, klinisch und laborchemisch relevante Blutungen, erfolgte Bluttransfusionen, oder eine Eisen- oder ESA-Therapie eruiert. Diese können allerdings alle mit einer Ab- oder Zunahme der Hb-Konzentration einhergehen. Dadurch konnten diese nicht adäquat in der Analyse der Folgeuntersuchung mitberücksichtigt werden. Zukünftig wäre es folglich notwendig, diese Parameter prospektiv genauer zu kontrollieren und einen festen Untersuchungszeitraum festzulegen. Außerdem sollte bestenfalls eine längere Nachbeobachtung zu mehreren Zeitpunkten mit festgelegten Zeitintervallen und regelmäßigen Messungen der Eryptoserate stattfinden, um eine mögliche Vorhersagbarkeit des Hb-Verlaufes bei CKD-Patienten über die Eryptoserate zu untersuchen.

Weiterhin bleibt aufgrund des Studiendesigns bei vielen der beobachteten Korrelationen unklar, welches die Ursache und welches die Folge ist, es können keine Rückschlüsse auf die Kausalität gezogen werden. Um Zusammenhänge diesbezüglich zu evaluieren, wäre ein interventionelles Vorgehen nötig. Ziel dieser Querschnittsstudie war es allerdings, Hypothesen für die zukünftige Forschung zu generieren.

## 5. Zusammenfassung

Viele Patienten mit chronischer Nierenkrankheit (CKD) leiden unter einer renalen Anämie, welche ihre Leistungsfähigkeit und Lebensqualität erheblich einschränkt und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Diese Anämie ist bei dialysepflichtigen CKD-Patienten nicht nur durch eine progressive Reduktion der endogenen Erythropoetin-Produktion und einen Eisenmangel, sondern außerdem durch einen vermehrten vorzeitigen Zelltod der Erythrozyten (Eryptose) bedingt. Weiterhin kann eine verstärkte Eryptose mit Mikrozirkulationsstörungen und einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen. Die Einschätzung der Eryptoserate mittels durchflusszytometrischer Messung der Phosphatidylserin- (PS-) Exposition auf der Erythrozyten-Oberfläche ist bei Dialysepatienten etabliert.

In der vorliegenden Querschnittsstudie wurde die PS-Exposition bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten aller Stadien und zum Vergleich bei gesunden Kontrollpersonen durchflusszytometrisch bestimmt. Dadurch konnte evaluiert werden, ob auch bei nicht-dialysepflichtigen Patienten eine vermehrte Eryptose vorliegt. Außerdem wurde analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Eryptoserate, der Hämoglobin- (Hb-) Konzentration und der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) und demographischen und laborchemischen Parametern vorlag. Es ergab sich eine signifikant erhöhte PS-Exposition bei den CKD-Patienten, die CKD-stadienabhängig zunahm. Die PS-Exposition korrelierte signifikant negativ mit der eGFR und der Hb-Konzentration der Patienten. Folglich könnte die Eryptose und die damit einhergehende verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten auch bei nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten signifikant zur renalen Anämie beitragen.

Die bisherige Therapie der Anämie bei CKD ist vor allem auf eine Steigerung der Erythropoese ausgerichtet. Zukünftig gilt es, eine Hemmung der Eryptose bei CKD-Patienten als ergänzende Therapieoption genauer zu untersuchen und die Wirksamkeit *in vitro* Eryptose-hemmender Substanzen bei CKD-Patienten zu überprüfen. Außerdem muss festgestellt werden, ob eine mögliche antieryptotische Therapie mit unerwünschten Wirkungen, wie beispielsweise einer vermehrt auftretenden Hämolyse, einhergehen würde.

## VI. Literaturverzeichnis

- AAPRO, M., VON HAEHLING, S., JELKMANN, W., LINK, H., MEYBOHM, P., SEILER, S. & ZACHAROWSKI, K. 2017. Anämie- und Blutmanagement: Neubewertung in verschiedenen Indikationen. *Dtsch Arztebl International*, 114, 29.
- ABED, M., ARTUNC, F., ALZOUBI, K., HONISCH, S., BAUMANN, D., FÖLLER, M. & LANG, F. 2014. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med (Berl)*, 92, 871-9.
- AHMED, M. S., ABED, M., VOELKL, J. & LANG, F. 2013a. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol*, 14, 244.
- AHMED, M. S. E., LANGER, H., ABED, M., VOELKL, J. & LANG, F. 2013b. The Uremic Toxin Acrolein Promotes Suicidal Erythrocyte Death. *Kidney and Blood Pressure Research*, 37, 158-167.
- AL MAMUN BHUYAN, A., BISSINGER, R., CAO, H. & LANG, F. 2017. Inhibition of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling by ASP3026. *Cell Physiol Biochem*, 43, 507-517.
- ARIAS, C. F. & ARIAS, C. F. 2017. How do red blood cells know when to die? *Royal Society open science* [Online], 4. [Accessed 2017/04/].
- ARTUNC, F. & RISLER, T. 2007. Serum erythropoietin concentrations and responses to anaemia in patients with or without chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 2900-8.
- ASTOR, B. C., CORESH, J., HEISS, G., PETTITT, D. & SARNAK, M. J. 2006. Kidney function and anemia as risk factors for coronary heart disease and mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J*, 151, 492-500.
- ASTOR, B. C., MATSUSHITA, K., GANSEVOORT, R. T., VAN DER VELDE, M., WOODWARD, M., LEVEY, A. S., JONG, P. E., CORESH, J., ASTOR, B. C., MATSUSHITA, K., GANSEVOORT, R. T., VAN DER VELDE, M., WOODWARD, M., LEVEY, A. S., DE JONG, P. E., CORESH, J., ELNAHAS, M., ECKARDT, K. U., KASISKE, B. L., WRIGHT, J., APPEL, L., GREENE, T., LEVIN, A., DJURDJEV, O., WHEELER, D. C., LANDRAY, M. J., TOWNEND, J. N., EMBERSON, J., CLARK, L. E., MACLEOD, A., MARKS, A., ALI, T., FLUCK, N., PRESCOTT, G., SMITH, D. H., WEINSTEIN, J. R., JOHNSON, E. S., THORP, M. L., WETZELS, J. F., BLANKESTIJN, P. J., VAN ZUILEN, A. D., MENON, V., SARNAK, M., BECK, G., KRONENBERG, F., KOLLERITS, B., FROISSART, M., STENGEL, B., METZGER, M., REMUZZI, G., RUGGENENTI, P., PERNA, A., HEERSPINK, H. J., BRENNER, B., DE ZEEUW, D., ROSSING, P., PARVING, H. H., AUGUSTE, P., VELDHIJ, K., WANG, Y., CAMARATA, L., THOMAS, B. & MANLEY, T. 2011. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int*, 79, 1331-40.

- BABITT, J. L., EISENGA, M. F., HAASE, V. H., KSHIRSAGAR, A. V., LEVIN, A., LOCATELLI, F., MAŁYSZKO, J., SWINKELS, D. W., TARNG, D. C., CHEUNG, M., JADOUL, M., WINKELMAYER, W. C. & DRÜEKE, T. B. 2021. Controversies in optimal anemia management: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. *Kidney Int*, 99, 1280-1295.
- BABITT, J. L. & LIN, H. Y. 2012. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1631-4.
- BATCHELOR, E. K., KAPITSINOU, P., PERGOLA, P. E., KOVESDY, C. P. & JALAL, D. I. 2020. Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*, 31, 456-468.
- BD BIOSCIENCES BD CellQuest™ Pro Version 5.2 ed. United States,
- BD BIOSCIENCES. 2021. *BD FACSCalibur™* [Online]. Available: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/clinical-instruments/clinical-cell-analyzers/facscalibur> [Accessed 20.03 2021].
- BD LIFE SCIENCES 2022. FlowJo™ Software for Windows [software application], Version 10.8.1. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company,
- BENNETT, C. L., BECKER, P. S., KRAUT, E. H., SAMARAS, A. T. & WEST, D. P. 2009. Intersecting guidelines: administering erythropoiesis-stimulating agents to chronic kidney disease patients with cancer. *Semin Dial*, 22, 1-4.
- BESARAB, A., KAISER, J. W. & FRINAK, S. 1999. A study of parenteral iron regimens in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 34, 21-28.
- BISSINGER, R., ARTUNC, F., QADRI, S. M. & LANG, F. 2016. Reduced Erythrocyte Survival in Uremic Patients Under Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. *Kidney Blood Press Res*, 41, 966-977.
- BISSINGER, R., BHUYAN, A. A. M., QADRI, S. M. & LANG, F. 2019. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal*, 286, 826-854.
- BISSINGER, R., NEMKOV, T., D'ALESSANDRO, A., GRAU, M., DIETZ, T., BOHNERT, B. N., ESSIGKE, D., WÖRN, M., SCHAEFER, L., XIAO, M., BEIRNE, J. M., KALO, M. Z., SCHORK, A., BAKCHOUL, T., OMAGE, K., KONG, L., GONZALEZ-MENENDEZ, I., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEHRENBACHER, B., SCHALLER, M., DHARIWAL, A., BIRKENFELD, A. L., GRAHAMMER, F., QADRI, S. M. & ARTUNC, F. 2021. Proteinuric chronic kidney disease is associated with altered red blood cell lifespan, deformability and metabolism. *Kidney Int*, 100, 1227-1239.
- BISSINGER, R., SCHAEFER, L., BOHNERT, B. N., SCHORK, A., HOERBER, S., PETER, A., QADRI, S. M., BIRKENFELD, A. L., HEYNE, N., BAKCHOUL, T., WIEDER, T. & ARTUNC, F. 2024. Glomerular filtration

- rate is a key determinant of red blood cell survival in anemia associated with progressive CKD. *Kidney International Reports*.
- BONAN, N. B., STEINER, T. M., KUNTSEVICH, V., VIRZÌ, G. M., AZEVEDO, M., NAKAO, L. S., BARRETO, F. C., RONCO, C., THIJSEN, S., KOTANKO, P., PECOITS-FILHO, R. & MORENO-AMARAL, A. N. 2016. Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. *Blood Purif*, 41, 317-23.
- BORST, O., ABED, M., ALESUTAN, I., TOWHID, S. T., QADRI, S. M., FÖLLER, M., GAWAZ, M. & LANG, F. 2012. Dynamic adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells via CXCL16/SR-PSOX. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, C644-51.
- BRIGLIA, M., ROSSI, M. A. & FAGGIO, C. 2017. Eryptosis: Ally or Enemy. *Curr Med Chem*, 24, 937-942.
- CHEN, X., ZHONG, Z., ZENGTAO, X., CHEN, L. & WANG, Y. 2010. 2',7' - Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free radical research*, 44, 587-604.
- COHEN, J. 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, New York, Routledge.
- DAOUD, J. I. 2017. Multicollinearity and Regression Analysis. *Journal of Physics: Conference Series*, 949, 012009.
- DEV, S. & BABITT, J. L. 2017. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int*, 21 Suppl 1, S6-s20.
- DIAS, G. F., BONAN, N. B., STEINER, T. M., TOZONI, S. S., RODRIGUES, S., NAKAO, L. S., KUNTSEVICH, V., PECOITS FILHO, R., KOTANKO, P. & MORENO-AMARAL, A. N. 2018. Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways. *Toxins*, 10, 280.
- DIAS, G. F., GROBE, N., ROGG, S., JÖRG, D. J., PECOITS-FILHO, R., MORENO-AMARAL, A. N. & KOTANKO, P. 2020. The Role of Eryptosis in the Pathogenesis of Renal Anemia: Insights From Basic Research and Mathematical Modeling. *Front Cell Dev Biol*, 8, 598148.
- DUFOUR, D. R. 1997. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 19th ed. J.B. Henry, ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996, 1556 pp., \$79.00. ISBN 0-7216-6030-4. *Clinical Chemistry*, 43, 197-198.
- ECKARDT, K.-U., CORESH, J., DEVUYST, O., JOHNSON, R. J., KÖTTGEN, A., LEVEY, A. S. & LEVIN, A. 2013. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 382, 158-169.
- EVANS, M., BOWER, H., COCKBURN, E., JACOBSON, S. H., BARANY, P. & CARRERO, J.-J. 2020. Contemporary management of anaemia,

- erythropoietin resistance and cardiovascular risk in patients with advanced chronic kidney disease: a nationwide analysis. *Clinical Kidney Journal*, 13, 821-827.
- FEHR, T., AMMANN, P., GARZONI, D., KORTE, W., FIERZ, W., RICKLI, H. & WÜTHRICH, R. P. 2004. Interpretation of erythropoietin levels in patients with various degrees of renal insufficiency and anemia. *Kidney Int*, 66, 1206-11.
- FINKELSTEIN, F. O., STORY, K., FIRANEK, C., MENDELSSOHN, D., BARRE, P., TAKANO, T., SOROKA, S. & MUJAJIS, S. 2009. Health-related quality of life and hemoglobin levels in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, 33-8.
- FISHBANE, S., POLLACK, S., FELDMAN, H. I. & JOFFE, M. M. 2009. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, 57-61.
- FISHER SCIENTIFIC. *Biotium Fluo-4, AM ester* [Online]. Available: <https://www.fishersci.com/shop/products/fluo-4-am-ester/nc1605982> [Accessed 21.03 2021].
- FÖLLER, M., KASINATHAN, R. S., KOKA, S., HUBER, S. M., SCHULER, B., VOGEL, J., GASSMANN, M. & LANG, F. 2007. Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1127-34.
- FÖLLER, M. & LANG, F. 2020. Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. *Front Cell Dev Biol*, 8, 597.
- FÖLLER, M., SOPJANI, M., MAHMUD, H. & LANG, F. 2008. Vanadate-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Kidney and Blood Pressure Research*, 31, 87-93.
- FOX, J., FRIENDLY, M. & MONETTE, G. 2021. heplots: Visualizing Tests in Multivariate Linear Models. R package version 1.3-9.
- FOX, J. & WEISBERG, S. 2019. *An {R} Companion to Applied Regression*, Thousand Oaks, CA, Sage.
- FRAENKEL, P. G. 2017. Anemia of Inflammation: A Review. *Med Clin North Am*, 101, 285-296.
- GANDRA, S. R., FINKELSTEIN, F. O., BENNETT, A. V., LEWIS, E. F., BRAZG, T. & MARTIN, M. L. 2010. Impact of erythropoiesis-stimulating agents on energy and physical function in nondialysis CKD patients with anemia: a systematic review. *Am J Kidney Dis*, 55, 519-34.
- GANSEVOORT, R. T., CORREA-ROTTER, R., HEMMELGARN, B. R., JAFAR, T. H., HEERSPINK, H. J., MANN, J. F., MATSUSHITA, K. & WEN, C. P. 2013. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 382, 339-52.
- GANSEVOORT, R. T., MATSUSHITA, K., VAN DER VELDE, M., ASTOR, B. C., WOODWARD, M., LEVEY, A. S., DE JONG, P. E. & CORESH, J. 2011. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with

- adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int*, 80, 93-104.
- GANZ, T. 2003. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102, 783-8.
- GAO, C., JI, S., DONG, W., QI, Y., SONG, W., CUI, D. & SHI, J. 2015. Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *Toxins*, 7, 4390-4403.
- GBD 2019 DISEASES AND INJURIES COLLABORATORS 2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 396, 1204-1222.
- GEDDES, C. C. 2018. Pathophysiology of renal anaemia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34, 921-922.
- GIRNDT, M., TROCCHI, P., SCHEIDT-NAVE, C., MARKAU, S. & STANG, A. 2016. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int*, 113, 85-91.
- GO, A. S., CHERTOW, G. M., FAN, D., MCCULLOCH, C. E. & HSU, C.-Y. 2004. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *New England Journal of Medicine*, 351, 1296-1305.
- GOK, M. G., PAYDAS, S., BORAL, B., ONAN, E. & KAYA, B. 2022. Evaluation of eryptosis in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*, 54, 2919-2928.
- GUEDES, M., ROBINSON, B. M., OBRADOR, G., TONG, A., PISONI, R. L. & PECOITS-FILHO, R. 2020. Management of Anemia in Nondialysis Chronic Kidney Disease: Current Recommendations, Real-World Practice, and Patient Perspectives. *Kidney360*, 1, 855-862.
- HAYES, W. 2019. Measurement of iron status in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 34, 605-613.
- HENRY, J. B., 1928-2009 *Clinical diagnosis and management by laboratory methods.*, United States, Philadelphia : Saunders, c1996.
- HEROLD, G. 2023. *INNERE MEDIZIN*, Dr. med. Gerd Herold und Mitarbeiter.
- HILL, N. R., FATOBA, S. T., OKE, J. L., HIRST, J. A., O'CALLAGHAN, C. A., LASSERSON, D. S. & HOBBS, F. D. 2016. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11, e0158765.
- HOUGEN, I., COLLISTER, D., BOURRIER, M., FERGUSON, T., HOCHHEIM, L., KOMENDA, P., RIGATTO, C. & TANGRI, N. 2018. Safety of Intravenous Iron in Dialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13.

- HUBER, P. J. 2011. Robust Statistics. In: LOVRIC, M. (ed.) *International Encyclopedia of Statistical Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- IBM CORP 2022. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. [Computer software]. Armonk, NY: IBM Corp,
- IM, K., MARENINOV, S., DIAZ, M. F. P. & YONG, W. H. 2019. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 1897, 299-311.
- INKER, L. A., GRAMS, M. E., LEVEY, A. S., CORESH, J., CIRILLO, M., COLLINS, J. F., GANSEVOORT, R. T., GUTIERREZ, O. M., HAMANO, T., HEINE, G. H., ISHIKAWA, S., JEE, S. H., KRONENBERG, F., LANDRAY, M. J., MIURA, K., NADKARNI, G. N., PERALTA, C. A., ROTHENBACHER, D., SCHAEFFNER, E., SEDAGHAT, S., SHLIPAK, M. G., ZHANG, L., VAN ZUILEN, A. D., HALLAN, S. I., KOVESDY, C. P., WOODWARD, M. & LEVIN, A. 2019. Relationship of Estimated GFR and Albuminuria to Concurrent Laboratory Abnormalities: An Individual Participant Data Meta-analysis in a Global Consortium. *Am J Kidney Dis*, 73, 206-217.
- INKER, L. A., SCHMID, C. H., TIGHIOUART, H., ECKFELDT, J. H., FELDMAN, H. I., GREENE, T., KUSEK, J. W., MANZI, J., VAN LENTE, F., ZHANG, Y. L., CORESH, J. & LEVEY, A. S. 2012. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med*, 367, 20-9.
- ISEKI, K. & KOHAGURA, K. 2007. Anemia as a risk factor for chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, S4-9.
- JEMAA, M., FEZAI, M. & LANG, F. 2017. Inhibition of Suicidal Erythrocyte Death by Reversine. *Cell Physiol Biochem*, 41, 2363-2373.
- JHA, V., GARCIA-GARCIA, G., ISEKI, K., LI, Z., NAICKER, S., PLATTNER, B., SARAN, R., WANG, A. Y. & YANG, C. W. 2013. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 382, 260-72.
- JOHANSEN, K. L., FINKELSTEIN, F. O., REVICKI, D. A., EVANS, C., WAN, S., GITLIN, M. & AGODOA, I. L. 2011. Systematic review of the impact of erythropoiesis-stimulating agents on fatigue in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27, 2418-2425.
- JONES, D. P. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1865-1879.
- KANNAN, K. & JAIN, S. K. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7, 153-163.
- KASSAMBARA, A. 2021. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.0.
- KDIGO 2013. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 3, 28.

- KDIGO, IMPROVING, K. D. & GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) ANEMIA WORK GROUP 2012. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 2, 279–335.
- KE, C., LIANG, J., LIU, M., LIU, S. & WANG, C. 2022. Burden of chronic kidney disease and its risk-attributable burden in 137 low-and middle-income countries, 1990–2019: results from the global burden of disease study 2019. *BMC Nephrology*, 23, 17.
- KEMPE, D. S., AKEL, A., LANG, P. A., HERMLE, T., BISWAS, R., MURESANU, J., FRIEDRICH, B., DREISCHER, P., WOLZ, C., SCHUMACHER, U., PESCHEL, A., GÖTZ, F., DÖRING, G., WIEDER, T., GULBINS, E. & LANG, F. 2007. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, 85, 273-81.
- KOVESDY, C. P., TRIVEDI, B. K., KALANTAR-ZADEH, K. & ANDERSON, J. E. 2006. Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease. *Kidney Int*, 69, 560-4.
- KRAGESTEEN, B. K., GILADI, A., DAVID, E., HALEVI, S., GEIRSDÓTTIR, L., LEMPKE, O. M., LI, B., BAPST, A. M., XIE, K., KATZENELNBOGEN, Y., DAHL, S. L., SHEBAN, F., GUREVICH-SHAPIRO, A., ZADA, M., PHAN, T. S., AVELLINO, R., WANG, S.-Y., BARBOY, O., SHLOMI-LOUBATON, S., WINNING, S., MARKWERTH, P. P., DEKALO, S., KEREN-SHAUL, H., KEDMI, M., SIKORA, M., FANDREY, J., KORNELIUSSEN, T. S., PRCHAL, J. T., ROSENZWEIG, B., YUTKIN, V., RACIMO, F., WILLERSLEV, E., GUR, C., WENGER, R. H. & AMIT, I. 2023. The transcriptional and regulatory identity of erythropoietin producing cells. *Nature Medicine*, 29, 1191-1200.
- KUHLMANN, U., BÖHLER, J., LUFT, F. C., KUNZENDORF, U. & ALSCHER, M. D. 2015. *Nephrologie*. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG,
- LANG, E., BISSINGER, R., GULBINS, E. & LANG, F. 2015. Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Apoptosis*, 20, 758-67.
- LANG, E. & LANG, F. 2015a. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 35-42.
- LANG, E. & LANG, F. 2015b. Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. *BioMed Research International*, 2015, 513518.
- LANG, E., QADRI, S. M. & LANG, F. 2012. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1236-43.
- LANG, E., QADRI, S. M., ZELENAK, C., GU, S., ROTTE, A., DRAEGER, A. & LANG, F. 2011. Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301, C490-8.

- LANG, F., BISSINGER, R., ABED, M. & ARTUNC, F. 2017. Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease. *Kidney Blood Press Res*, 42, 749-760.
- LANG, F., GULBINS, E., LANG, P. A., ZAPPULLA, D. & FÖLLER, M. 2010. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 26, 21-8.
- LANG, F., LANG, K. S., LANG, P. A., HUBER, S. M. & WIEDER, T. 2006. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1183-1192.
- LANG, F. & QADRI, S. M. 2012. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif*, 33, 125-30.
- LARSSON, A., HULT, A., NILSSON, A., OLSSON, M. & OLDENBORG, P. A. 2016. Red blood cells with elevated cytoplasmic Ca(2+) are primarily taken up by splenic marginal zone macrophages and CD207+ dendritic cells. *Transfusion*, 56, 1834-44.
- LEFEBVRE, P., VEKEMAN, F., SAROKHAN, B., ENNY, C., PROVENZANO, R. & CREMIEUX, P. Y. 2006. Relationship between hemoglobin level and quality of life in anemic patients with chronic kidney disease receiving epoetin alfa. *Curr Med Res Opin*, 22, 1929-37.
- LEVEY, A. S., ATKINS, R., CORESH, J., COHEN, E. P., COLLINS, A. J., ECKARDT, K. U., NAHAS, M. E., JABER, B. L., JADOUL, M., LEVIN, A., POWE, N. R., ROSSERT, J., WHEELER, D. C., LAMEIRE, N. & EKNOYAN, G. 2007. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int*, 72, 247-59.
- LEVEY, A. S., STEVENS, L. A., SCHMID, C. H., ZHANG, Y. L., CASTRO, A. F., 3RD, FELDMAN, H. I., KUSEK, J. W., EGGERS, P., VAN LENTE, F., GREENE, T. & CORESH, J. 2009. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 150, 604-12.
- LI, D., ZHENG, X., ZHANG, Y., LI, X., CHEN, X., YIN, Y., HU, J., LI, J., GUO, M. & WANG, X. 2022. What Should Be Responsible for Eryptosis in Chronic Kidney Disease? *Kidney Blood Press Res*, 47, 375-390.
- LI, J. H., LUO, J. F., JIANG, Y., MA, Y. J., JI, Y. Q., ZHU, G. L., ZHOU, C., CHU, H. W. & ZHANG, H. D. 2019. Red Blood Cell Lifespan Shortening in Patients with Early-Stage Chronic Kidney Disease. *Kidney and Blood Pressure Research*, 44, 1158-1165.
- LING, X. C. & KUO, K.-L. 2018. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Renal Replacement Therapy*, 4, 53.
- LIPPI, G., FRANCHINI, M. & FAVALORO, E. J. 2010. Thrombotic complications of erythropoiesis-stimulating agents. *Semin Thromb Hemost*, 36, 537-49.
- LIPSCHITZ, D. A., COOK, J. D. & FINCH, C. A. 1974. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med*, 290, 1213-6.

- LIU, J., BHUYAN, A. A. M., MA, K., ZHANG, S., CHENG, A. & LANG, F. 2020. Inhibition of suicidal erythrocyte death by pyrogallol. *Mol Biol Rep*, 47, 5025-5032.
- MA, J., DOU, Y., ZHANG, H., THIJSSSEN, S., WILLIAMS, S., KUNTSEVICH, V., OUELLET, G., WONG, M. M. Y., PERSIC, V., KRUSE, A., ROSALES, L., WANG, Y., LEVIN, N. W. & KOTANKO, P. 2017. Correlation between Inflammatory Biomarkers and Red Blood Cell Life Span in Chronic Hemodialysis Patients. *Blood Purification*, 43, 200-205.
- MACDOUGALL, I. C., BIRCHER, A. J., ECKARDT, K. U., OBRADOR, G. T., POLLOCK, C. A., STENVINKEL, P., SWINKELS, D. W., WANNER, C., WEISS, G. & CHERTOW, G. M. 2016. Iron management in chronic kidney disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*, 89, 28-39.
- MACDOUGALL, I. C., BOCK, A. H., CARRERA, F., ECKARDT, K. U., GAILLARD, C., VAN WYCK, D., ROUBERT, B., NOLEN, J. G. & ROGER, S. D. 2014. FIND-CKD: a randomized trial of intravenous ferric carboxymaltose versus oral iron in patients with chronic kidney disease and iron deficiency anaemia. *Nephrol Dial Transplant*, 29, 2075-84.
- MAHMUD, H., MAURO, D., FOLLER, M. & LANG, F. 2009. Inhibitory effect of thymol on suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 24, 407-14.
- MAHMUD, H., QADRI, S. M., FÖLLER, M. & LANG, F. 2010. Inhibition of suicidal erythrocyte death by vitamin C. *Nutrition*, 26, 671-6.
- MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11.
- MEDCALC SOFTWARE LTD 2023a. MedCalc Statistical Software Version 20.215. Ostend, Belgium: MedCalc Software bv,
- MEDCALC SOFTWARE LTD. 2023b. *Multiple regression* [Online]. Available: <https://www.medcalc.org/manual/multiple-regression.php> [Accessed 19.03.2023].
- MICROSOFT CORPORATION 2023a. Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO, Version 2302.
- MICROSOFT CORPORATION 2023b. Microsoft PowerPoint für Microsoft 365 MSO, Version 2302.
- MICROSOFT CORPORATION 2023c. Microsoft Word für Microsoft 365 MSO, Version 2302.
- MIRSAEIDI, M., GIDFAR, S., VU, A. & SCHRAUFNAGEL, D. 2016. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *Journal of Translational Medicine*, 14, 89.
- MUCKENTHALER, M. U., RIVELLA, S., HENTZE, M. W. & GALY, B. 2017. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, 168, 344-361.
- MYSSINA, S., HUBER, S. M., BIRKA, C., LANG, P. A., LANG, K. S., FRIEDRICH, B., RISLER, T., WIEDER, T. & LANG, F. 2003. Inhibition of

- Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, 2750-2757.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION 2002. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39, S1-266.
- NAVARRO, D. J. 2015. Learning statistics with R: A tutorial for psychology students and other beginners. (Version 0.6). University of New South Wales. Sydney, Australia, R package version 0.5.1.
- NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. & WASSERMAN, W. 1996. *Applied linear statistical models*, Chicago, Irwin.
- NICOLAY, J. P., LIEBIG, G., NIEMOELLER, O. M., KOKA, S., GHASHGHAENIA, M., WIEDER, T., HAENDELER, J., BUSSE, R. & LANG, F. 2008. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch*, 456, 293-305.
- NICOLAY, J. P., SCHNEIDER, J., NIEMOELLER, O. M., ARTUNC, F., PORTERO-OTIN, M., HAIK JR, G., THORNALLEY, P. J., SCHLEICHER, E., WIEDER, T. & LANG, F. 2006. Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Methylglyoxal. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 18, 223-232.
- NISSENSON, A. R., WADE, S., GOODNOUGH, T., KNIGHT, K. & DUBOIS, R. W. 2005. Economic burden of anemia in an insured population. *J Manag Care Pharm*, 11, 565-74.
- OFFICIOSO, A., ALZOUBI, K., LANG, F. & MANNA, C. 2016. Hydroxytyrosol inhibits phosphatidylserine exposure and suicidal death induced by mercury in human erythrocytes: Possible involvement of the glutathione pathway. *Food Chem Toxicol*, 89, 47-53.
- OGAWA, T. & NITTA, K. 2015. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness in end-stage renal disease patients. *Contrib Nephrol*, 185, 76-86.
- PALMER, S. C., NAVANEETHAN, S. D., CRAIG, J. C., JOHNSON, D. W., TONELLI, M., GARG, A. X., PELLEGRINI, F., RAVANI, P., JARDINE, M., PERKOVIC, V., GRAZIANO, G., MCGEE, R., NICOLUCCI, A., TOGNONI, G. & STRIPPOLI, G. F. 2010. Meta-analysis: erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med*, 153, 23-33.
- PAN, X., SUZUKI, N., HIRANO, I., YAMAZAKI, S., MINEGISHI, N. & YAMAMOTO, M. 2011. Isolation and Characterization of Renal Erythropoietin-Producing Cells from Genetically Produced Anemia Mice. *PLOS ONE*, 6, e25839.
- PANWAR, B. & GUTIÉRREZ, O. M. 2016. Disorders of Iron Metabolism and Anemia in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol*, 36, 252-61.
- PERLMAN, R. L., FINKELSTEIN, F. O., LIU, L., ROYS, E., KISER, M., EISELE, G., BURROWS-HUDSON, S., MESSANA, J. M., LEVIN, N.,


- RAJAGOPALAN, S., PORT, F. K., WOLFE, R. A. & SARAN, R. 2005. Quality of life in chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional analysis in the Renal Research Institute-CKD study. *Am J Kidney Dis*, 45, 658-66.
- POPOLO, A., AUTORE, G., PINTO, A. & MARZOCCO, S. 2013. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radic Res*, 47, 346-56.
- PORTOLÉS, J., GORRIZ, J. L., RUBIO, E., DE ALVARO, F., GARCÍA, F., ALVAREZ-CHIVAS, V., ARANDA, P., MARTINEZ-CASTELAO, A. & GROUP, N.-S. 2013. The development of anemia is associated to poor prognosis in NKF/KDOQI stage 3 chronic kidney disease. *BMC Nephrology*, 14, 2.
- PORTOLÉS, J., MARTÍN, L., BROSETA, J. J. & CASES, A. 2021. Anemia in Chronic Kidney Disease: From Pathophysiology and Current Treatments, to Future Agents. *Front Med (Lausanne)*, 8, 642296.
- PRETORIUS, E., DU PLOOY, J. N. & BESTER, J. 2016. A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cell Physiol Biochem*, 39, 1977-2000.
- QADRI, S. M., BISSINGER, R., SOLH, Z. & OLDENBORG, P. A. 2017. Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Rev*, 31, 349-361.
- QADRI, S. M., FÖLLER, M. & LANG, F. 2009. Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol. *Life Sci*, 85, 33-8.
- R CORE TEAM 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing,
- REPSOLD, L. & JOUBERT, A. M. 2018. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *Biomed Res Int*, 2018, 9405617.
- REVELLE, W. 2021. psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Northwestern University. Evanston, Illinois, USA, R package version 2.1.9.
- RIFKIND, J. M., ZHANG, L., LEVY, A. & MANOHARAN, P. T. 1991. The Hypoxic Stress on Erythrocytes Associated with Superoxide Formation. *Free Radical Research Communications*, 13, 645-652.
- RSTUDIO TEAM 2020. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: RStudio, PBC,
- SATO, Y., MIZUGUCHI, T., SHIGENAGA, S., YOSHIKAWA, E., CHUJO, K., MINAKUCHI, J. & KAWASHIMA, S. 2012. Shortened Red Blood Cell Lifespan Is Related to the Dose of Erythropoiesis-Stimulating Agents Requirement in Patients on Hemodialysis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 16, 522-528.
- SCHMIDT, A. F. & FINAN, C. 2018. Linear regression and the normality assumption. *J Clin Epidemiol*, 98, 146-151.

- SCHÖDEL, J. & RATCLIFFE, P. J. 2019. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol*, 15, 641-659.
- SCHRÖPPEL, B. 2022. HIF-PH-Inhibitoren in der Therapie der renalen Anämie. *Alternative zu Erythropoetin-Stimulanzien*, 26, 453-459.
- SEGAWA, K. & NAGATA, S. 2015. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol*, 25, 639-650.
- SELKER, R., JONATHON, L., DROPMANN, D. & MORENO, V. 2021. jmv: The 'jamovi' Analyses. R package version 2.0.
- SETTY, B. N. Y. & BETAL, S. G. 2008. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood*, 111, 905-914.
- SHAIK, N., ZBIDAH, M. & LANG, F. 2012. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> entry and suicidal erythrocyte death by naringin. *Cell Physiol Biochem*, 30, 678-86.
- SHAN, F., YANG, R., JI, T. & JIAO, F. 2016. Vitamin C Inhibits Aggravated Eryptosis by Hydrogen Peroxide in Glucose-6-Phosphated Dehydrogenase Deficiency. *Cell Physiol Biochem*, 39, 1453-62.
- SINGH, A. K., SZCZECH, L., TANG, K. L., BARNHART, H., SAPP, S., WOLFSON, M. & REDDAN, D. 2006. Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine*, 355, 2085-2098.
- STACK, A. G., ALGHALI, A., LI, X., FERGUSON, J. P., CASSERLY, L. F., CRONIN, C. J., REDDAN, D. N., HUSSEIN, W. & ELSAYED, M. E. 2017. Quality of care and practice patterns in anaemia management at specialist kidney clinics in Ireland: a national study. *Clinical Kidney Journal*, 11, 99-107.
- STANCU, S., STANCIU, A., ZUGRAVU, A., BÂRSAN, L., DUMITRU, D., LIPAN, M. & MIRCESCU, G. 2010. Bone marrow iron, iron indices, and the response to intravenous iron in patients with non-dialysis-dependent CKD. *Am J Kidney Dis*, 55, 639-47.
- SUN, Y., LIU, G., JIANG, Y., WANG, H., XIAO, H. & GUAN, G. 2018. Erythropoietin Protects Erythrocytes Against Oxidative Stress-Induced Eryptosis In Vitro. *Clin Lab*, 64, 365-369.
- SUN, Y., LIU, G., LI, X., SHI, Y. & GUAN, G. 2015. L-Carnitine inhibits eryptosis induced by uremic serum and the related mechanisms. *Ren Fail*, 37, 1050-6.
- TERAWAKI, H., YOSHIMURA, K., HASEGAWA, T., MATSUYAMA, Y., NEGAWA, T., YAMADA, K., MATSUSHIMA, M., NAKAYAMA, M., HOSOYA, T. & ERA, S. 2004. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int*, 66, 1988-93.
- THE ENDNOTE TEAM 2013. EndNote. Philadelphia, PA: Clarivate,

- TITZE, S., SCHMID, M., KÖTTGEN, A., BUSCH, M., FLOEGE, J., WANNER, C., KRONENBERG, F. & ECKARDT, K. U. 2015. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort. *Nephrol Dial Transplant*, 30, 441-51.
- TOFT, G., HEIDE-JØRGENSEN, U., VAN HAALEN, H., JAMES, G., HEDMAN, K., BIRN, H., CHRISTIANSEN, C. F. & THOMSEN, R. W. 2020. Anemia and clinical outcomes in patients with non-dialysis dependent or dialysis dependent severe chronic kidney disease: a Danish population-based study. *Journal of Nephrology*, 33, 147-156.
- VIRZÌ, G. M., MILAN MANANI, S., CLEMENTI, A., CASTEGNARO, S., BROCCA, A., RIELLO, C., DE CAL, M., GIULIANI, A., BATTAGLIA, G. G., CREPALDI, C. & RONCO, C. 2019. Eryptosis Is Altered in Peritoneal Dialysis Patients. *Blood Purification*, 48, 351-357.
- VOELKL, J., ALZOUBI, K., MAMAR, A. K., AHMED, M. S. E., ABED, M. & LANG, F. 2013. Stimulation of Suicidal Erythrocyte Death by Increased Extracellular Phosphate Concentrations. *Kidney and Blood Pressure Research*, 38, 42-51.
- WAGNER, M., ALAM, A., ZIMMERMANN, J., RAUH, K., KOLJAJA-BATZNER, A., RAFF, U., WANNER, C. & SCHRAMM, L. 2011. Endogenous erythropoietin and the association with inflammation and mortality in diabetic chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6, 1573-9.
- WEIR, M. R. 2021. Managing Anemia across the Stages of Kidney Disease in Those Hyporesponsive to Erythropoiesis-Stimulating Agents. *Am J Nephrol*, 52, 450-466.
- WENGER, R. H. & HOOGEWIJS, D. 2010. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F1287-96.
- WICKHAM, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, New York, NY, Springer-Verlag.
- WICKHAM, H. 2021. tidy: Tidy Messy Data. R package version 1.1.4.
- WICKHAM, H. & BRYAN, J. 2019. readxl: Read Excel Files, R package version 1.3.1. R package version 1.3.1.
- WICKHAM, H., FRANÇOIS, R., HENRY, L. & MÜLLER, K. 2021. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.7.
- WISH, J. B. 2006. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1 Suppl 1, S4-8.
- YANG, X., ZHAO, B., WANG, J., WANG, L., TAO, M., LU, J., LIN, J., SUN, J. & WANG, R. 2021. Red blood cell lifespan in long-term hemodialysis patients treated with roxadustat or recombinant human erythropoietin. *Ren Fail*, 43, 1428-1436.
- ZARITSKY, J., YOUNG, B., WANG, H. J., WESTERMAN, M., OLBINA, G., NEMETH, E., GANZ, T., RIVERA, S., NISSENSON, A. R. & SALUSKY, I.

- B. 2009. Hepcidin--a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, 1051-6.
- ZIERLE, J., BISSINGER, R. & LANG, F. 2016. Inhibition by Teriflunomide of Erythrocyte Cell Membrane Scrambling Following Energy Depletion, Oxidative Stress and Ionomycin. *Cell Physiol Biochem*, 39, 1877-1890.
- ZOLLER, H. 2021. DFP-Literaturstudium: Eisenmangel. *Österreichische Ärztezeitung*, 17, 48-54.
- ZUMBRENNEN-BULLOUGH, K. & BABITT, J. L. 2014. The iron cycle in chronic kidney disease (CKD): from genetics and experimental models to CKD patients. *Nephrol Dial Transplant*, 29, 263-73.

## VII. Anhang: Aufklärungstext und Einwilligungserklärung

 <p><b>Universitätsklinikum Tübingen</b></p>	<p><b>Medizinische Klinik</b>  <b>Abteilung Innere Medizin IV</b>          Endokrinologie und Diabetologie          Nephrologie</p> <p>Ärztlicher Direktor          Prof. Dr. med. Andreas Birkenfeld          Sektion Nieren- und          Hochdruckkrankheiten          Leitung: Prof. Dr. med. Nils Heyne</p> <p>Prof. Dr. med. Ferruh Artunc          Otfried-Müller-Straße 10          72076 Tübingen</p>
<p>Medizinische Klinik · Otfried-Müller-Str. 10 · 72076 Tübingen</p>	

Informationsblatt zur Studie: *„Hemmung der Erythrozytenapoptose - eine neue Strategie zur Behandlung der Anämie bei Niereninsuffizienz“*

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Sektion für Nieren- und Hochdruckkrankheiten in der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Tübingen führt eine Studie zur Erforschung der Rolle der Apoptose (auch programmierter Zelltod genannt) bei roten Blutkörperchen (Erythrozyten) durch. Erythrozyten sind in der Lage, eine Art programmierten Zelltod auszuführen und damit ihre Lebenszeit aktiv zu beeinflussen und zu regulieren. Dies ist natürlich von großer Bedeutung für die Physiologie aber auch für die Pathophysiologie dieses Zelltyps, insbesondere bei Patienten mit Blutarmut (Anämie) wie sie z.B. bei chronischer Niereninsuffizienz auftritt.

Unsere Untersuchungen zielen darauf ab, Veränderungen in der Apoptoseempfindlichkeit der Erythrozyten von chronisch niereninsuffizienten Patienten mit Anämie im Vergleich zu Erythrozyten von gesunden Probanden aufzudecken. Es sollen also zwei Gruppen miteinander verglichen werden. Weiterhin sollen die an der Erythrozytenapoptose beteiligten Mechanismen aufgeklärt werden und somit die Gründe für die Unterschiede beider Gruppen untersucht werden.

**Ausgangsmaterial für die Isolierung der Erythrozyten ist Ihre Blutprobe, um die wir Sie mit diesem Informationsschreiben bitten. Zudem bitten wir Sie um die Abgabe einer Urinprobe, anhand derer die Nierenfunktion bestimmt werden kann.**

Das Ergebnis der Untersuchung dient dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn mit direktem Bezug zu möglichen Mechanismen der Krankheitsentstehung. Die medizinische Bedeutung der erhobenen Befunde ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht klar abzusehen, weshalb wir von einer Mitteilung über die mit Ihrem Blut und Urin erhobenen Daten absehen. Somit hätten Sie persönlich zunächst keinen Nutzen von der Teilnahme an der Studie. Allerdings können unsere Untersuchungen zur Apoptoseempfindlichkeit von Erythrozyten in Zukunft den Weg für neue diagnostische bzw. therapeutische Verfahren ebnen. Dies wird jedoch noch mehrere Jahre in Anspruch nehmen.

Im Allgemeinen werden die Blutproben sofort aufgearbeitet und analysiert. Der Zeitraum, in dem Blut abgenommen und Proben gewonnen werden können, ist zunächst auf 2 Jahre begrenzt. Da sich die Analysen jedoch langwierig und aufwendig gestalten können, ist die

## Studie „Hemmung der Erythrozytenapoptose“ bei Niereninsuffizienz

Gewinnung von Daten aus dem Blutplasma nicht auf einen bestimmten zeitlichen Rahmen festgelegt. Mit Ihrer Teilnahme erklären Sie Ihr Einverständnis zur Verwendung Ihrer

Blutproben für die genannten Untersuchungen auf höchstens 15 Jahre bzw. den von Ihnen bestimmten Widerruf. Die Urinprobe wird unmittelbar nach Urinabgabe analysiert. Wir möchten Sie dennoch bitten, durch Ihre Bereitschaft zur Mitarbeit dieses Forschungsprojekt zu unterstützen.

Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, dass die Teilnahme an dieser Studie **Ihre freiwillige Entscheidung** ist. Ihre Angaben und persönlichen Daten werden vertraulich behandelt und unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung der studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen. Bei ergänzenden Untersuchungen an auswärtigen Institutionen erfolgt die Weitergabe der Blutprobe in verschlüsselter, pseudonymisierter Form. Ihr Einverständnis an der Studienteilnahme kann von Ihnen jederzeit ohne Angabe von Gründen formlos widerrufen werden, ohne dass daraus für Sie irgendwelche Nachteile entstehen. In diesem Fall wird Ihre Blutprobe vernichtet, Ihre persönlichen Daten werden gelöscht und die bis dato gewonnenen Ergebnisse vernichtet.

**Die Blutentnahme (10 ml venöses Vollblut, Lithiumheparin-Röhrchen) erfolgt durch einen Arzt oder eine ausgebildete Fachkraft im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme.** In Einzelfällen können dabei örtliche Blutergüsse oder Entzündungen auftreten, die meist innerhalb weniger Tage abklingen. Es kann auch zu Missempfindungen in der Umgebung des Einstichs durch unbeabsichtigte Verletzung von Hautnerven kommen. Ebenso kann es zu einer Verletzung des Nervus medianus kommen. In diesem Fall handelt es sich um eine schwerwiegende Verletzung. Ebenfalls kann es zur Bildung von kleinen Narben kommen. Außerdem kommt es in seltenen Fällen zu einer Thrombophlebitis (Venenentzündung), einer Thrombose oder einer Embolie. Es kann auch eine vasovagale Reaktion auftreten.

**Information zum Umgang mit den in der Studie erhobenen Daten**

Im Rahmen der Studie („Hemmung der Erythrozytenapoptose-eine neue Strategie zur Behandlung der Anämie bei Niereninsuffizienz“) werden personenbezogene Daten (Namen, Geburtstag, Adresse, Vorbefunde, studienbezogene Befunde einschließlich bildgebender Verfahren, Ergebnisse studienbezogener genetischer Untersuchungen u.a.) erhoben und verarbeitet.

In die Verarbeitung werden, soweit erforderlich, auch Ihre Krankheitsdaten einbezogen. Die Dokumentation Ihrer Daten und deren Archivierung erfolgt pseudonymisiert in einer geschützten elektronischen Datenbank, zu der nur befugte Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter einschließlich auf das Berufs- und Datengeheimnis verpflichteter Doktorandinnen und Doktoranden Zutritt haben. Zur Überprüfung der korrekten Übertragung der Behandlungsdaten aus Ihrer Krankenakte in die verschlüsselte Studiendatenbank dürfen bevollmächtigte Personen (sogenannte Monitore) Einblick in die persönlichen Krankheitsdaten nehmen, die mit der Studie im Zusammenhang stehen. Alle beteiligten Mitarbeiter unterliegen der Schweigepflicht.

Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten können auch für künftige Forschungsvorhaben der Klinik bzw. des Instituts genutzt und weiterverarbeitet werden.

Die Verarbeitung und Nutzung der pseudonymisierten Daten erfolgt auf Erhebungsbögen und elektronischen Datenträgern im Regelfall für die Dauer von 10 Jahren, soweit der Zweck

Studie „Hemmung der Erythrozytenapoptose“ bei Niereninsuffizienz

der Studie, z. B. bei Einbringung in eine Datenbank und bei Langzeitstudien keine längere Speicherdauer erfordert.

Die im Verlauf dieser Studie gewonnenen Informationen können für wissenschaftliche Zwecke auch an Kooperationspartner im Geltungsbereich der Europäischen Datenschutz-Grundverordnung und an Kooperationspartner außerhalb des Europäischen Wirtschaftsraumes, d.h. in Länder mit geringerem Datenschutzniveau (dies gilt auch für die USA) übermittelt werden.

Die Forschungsergebnisse aus der Studie werden in anonymisierter Form in Fachzeitschriften oder in wissenschaftlichen Datenbanken veröffentlicht. Bei der Veröffentlichung der Forschungsergebnisse wird Ihre Identität nicht bekannt. Die Prüfarzte vor Ort können jedoch mit Hilfe einer Patientenliste bei Rückfragen die Daten zu Ihrer Person zurückführen.

Sie können jederzeit Auskunft über Ihre gespeicherten Daten verlangen und haben das Recht, fehlerhafte Daten berichtigen zu lassen. Sie können auch jederzeit verlangen, dass Ihre Daten gelöscht oder anonymisiert werden, so dass ein Bezug zu Ihrer Person nicht mehr hergestellt werden kann.

Der Studienleiter/die Studienleiterin (Prof. Dr. Ferruh Artunc, Abteilung Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Tübingen) ist für die Datenverarbeitung und die Einhaltung der gesetzlichen Datenschutzbestimmungen verantwortlich.

Bei Beschwerden können Sie sich an den Datenschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Tübingen oder den Landesdatenschutzbeauftragten des Landes Baden-Württemberg wenden.

Für die Erhebung, Speicherung, Nutzung und Weitergabe Ihrer Daten ist Ihre ausdrückliche Zustimmung durch Unterzeichnung der Einwilligungserklärung zum Datenschutz erforderlich.

**Fragen/Notizen:**

### **Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme**

Hiermit bekunde ich mein Einverständnis freiwillig an o.g. Studie teilzunehmen. Über das Studienziel sowie über den geplanten Untersuchungsablauf bin ich sowohl in mündlicher wie in schriftlicher Form aufgeklärt worden. Ich habe die Informationen für den Patienten gelesen, verstanden und deren Inhalt zur Kenntnis genommen; weitere Fragen meinerseits wurden mir beantwortet.

Die Studienteilnahme ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Behandlung widerrufen werden. Die erhobenen Daten unterliegen dem Arztgeheimnis und dürfen nur in anonymisierter Form ausgewertet werden.

Vor- und Zuname: .....Geburtsdatum: .....

Tübingen, den		
	Unterschrift Prüfarzt	Unterschrift Patient

Studie „Hemmung der Erythrozytenapoptose“ bei Niereninsuffizienz

### Information zum Datenschutz

Ich erkläre, dass ich mit der im Rahmen der o.g. Studie erfolgenden Erhebung und Verarbeitung von Daten und ihrer verschlüsselten (pseudonymisierten) Weitergabe einverstanden bin.

Ich stimme zu, dass bevollmächtigte Personen zum Zwecke der Überprüfung der Daten Einblick in meine persönliche Krankenakte nehmen dürfen und entbinde den behandelnden Arzt insoweit von seiner ärztlichen Schweigepflicht.

Mir ist bewusst, dass die Ergebnisse dieser Studie in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden, allerdings in anonymisierter Form, so dass ein direkter Bezug zu meiner Person nicht hergestellt werden kann.

Ich wurde darüber informiert, dass ich jederzeit Auskunft über meine gespeicherten Daten und die Berichtigung von fehlerhaften Daten verlangen kann.

Ich weiß, dass ich jederzeit, beispielsweise beim Widerruf der Studienteilnahme, verlangen kann, dass meine bis dahin erhobenen Daten gelöscht oder unverzüglich anonymisiert werden.

Ich erkläre, dass ich über die Erhebung und Verarbeitung meiner in dieser Studie erhobenen Daten und meine Rechte angemessen informiert wurde.

Ich stimme der Verwendung der im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten in der oben (oder in der Information zum Datenschutz) beschriebenen Form zu.

Kontaktinformationen:

Tübingen, den		
	Unterschrift Prüfarzt	Unterschrift Patient

## VIII. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Promotionsarbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin IV der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A. Birkenfeld), Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten (Leiter: Prof. Dr. N. Heyne), unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Artunc durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Artunc und Frau Dr. Bissinger.

Die Rekrutierung der Patienten und Kontrollprobanden erfolgte durch Mitarbeiter und Ärzte der Nephrologischen Ambulanz und das Team des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin und mich.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Bissinger von mir eigenständig durchgeführt. Die Dokumentation aller Patientendaten und die laborchemischen Messungen der Kontrollprobanden erfolgten eigenständig durch mich. Die Nachbestimmung der Laborparameter aus Plasma und Spontanurin erfolgte nach meiner Vorbereitung der Proben durch Mitarbeiter des Zentrallabors des Universitätsklinikums Tübingen.

Die Literaturrecherche wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Absprache mit Herrn Prof. Dr. Artunc und Frau Dr. Bissinger eigenständig durch mich.

Das Projekt wurde gefördert durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Tübingen und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Ich versichere hiermit, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## IX. Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits unter folgendem Titel veröffentlicht:

### Poster:

Progression der chronischen Niereninsuffizienz ist mit zunehmender Eryptose und Anämie assoziiert. Schaefer L, Bissinger R, Artunc F. Kongress für Nephrologie 2022, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 6. – 9. Oktober 2022, Berlin.

### Paper:

Rosi Bissinger, Lina Schaefer, Bernhard N. Bohnert, Anja Schork, Sebastian Hoerber, Andreas Peter, Syed M. Qadri, Andreas L. Birkenfeld, Nils Heyne, Tamam Bakchoul, Thomas Wieder, Ferruh Artunc, GFR is a Key Determinant of Red Blood Cell Survival in Anemia Associated With Progressive CKD, *Kidney International Reports*, Volume 10, Issue 3, 2025, Pages 730-742, ISSN 2468-0249, <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2024.12.023>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468024924034247>)

Proteinuric chronic kidney disease is associated with altered red blood cell lifespan, deformability and metabolism (2021). Bissinger R, Nemkov T, D'Alessandro A, Grau M, Dietz T, Bohnert B N, Essigke D, Wörn M, Schaefer L, Xiao M, Beirne J M, Kalo M Z, Schork A, Bakchoul T, Omage K, Kong L, Gonzalez-Mendez I, Quintanilla-Martinez L, Fehrenbacher B, Schaller M, Dhariwal A, Birkenfeld A L, Grahammer F, Qadri S M, Artunc F. *Kidney Int*, 100, 1227-1239.

## X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den folgenden Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre:

Ich danke allen Patienten und Kontrollpersonen, die an dieser Studie teilgenommen haben, und wünsche Ihnen alles Gute für Ihre Zukunft.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ferruh Artunc, für die freundliche und umfassende Betreuung meiner Arbeit und dafür, dass er mir stets mit konstruktiver Hilfe und mannigfachen Ideen zur Seite stand. Ich danke außerdem sehr meiner Betreuerin Frau Dr. Rosi Bisinger für Ihre nette Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projekts. Mein Dank gilt außerdem Frau Privatdozentin Dr. K. Althaus für die hilfsbereite Betreuung als Zweitgutachterin.

Außerdem danken möchte ich dem ärztlichen Direktor der Abteilung Herrn Prof. Dr. Andreas Birkenfeld, dem Leiter Herrn Prof. Dr. Nils Heyne und allen Mitarbeitern der Sektion für Nieren- und Hochdruckkrankheiten für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Florian Lang und Herrn Prof. Dr. Thomas Wieder für die Erlaubnis, Messungen an Geräten im Labor des Physiologischen Instituts durchzuführen. Vielen Dank außerdem an den ärztlichen Direktor Prof. Dr. Taman Bakchoul und die Mitarbeiterinnen des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin Tübingen, ohne deren freundliche Unterstützung die Rekrutierung der zahlreichen Kontrollprobanden nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danken möchte ich dem ärztlichen Leiter Herrn Prof. Dr. Andreas Peter und allen Mitarbeitern des Zentrallabors des Universitätsklinikums Tübingen für die Durchführung der laborchemischen Messungen an den Geräten des Zentrallabors.

Sehr dankbar bin ich außerdem für die Unterstützung bei der statistischen Analyse durch Franziska Träuble.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner Familie, vor allem meinen Eltern und Schwestern, die mir jederzeit mit motivierenden Worten zur Seite standen,

meine Arbeit kritisch betrachteten und durch ihre Unterstützung dafür gesorgt haben, dass die Anfertigung dieser Doktorarbeit, aber auch mein bisheriger Lebensweg generell, möglich waren. Ihnen widme ich diese Arbeit.