

Aus der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Haffner

**Fetuin-A und Fibroblast Growth Factor-23
bei Patienten mit Atherosklerose:
Systemische Konzentrationen und Expression in der Gefäßwand**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Mathias Voigt
geb. am 29.01.1982 in Rostock

Rostock, im Februar 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dieter Haffner
Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock

Gutachter: 2. Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Institut für Pathologie der Universität Rostock

Gutachter: 3. Prof. Dr. med. Markus Ketteler
Nephrologische Klinik, Klinikum Coburg,
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg

Tag der Verteidigung: 23.11.2011

Tag der Einreichung: 22.02.2011

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abkürzungen	
III	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	
1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Epidemiologie, Risikofaktoren und Definition der Atherosklerose	1
1.1.2	Pathogenese der Plaquebildung	2
1.1.3	Mineralisierung der atherosklerotischen Gefäßwand	4
1.2	Struktur und Funktion von Fetuin-A	7
1.3	Struktur und Funktion des Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23)	9
2	Ziel der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Studienablauf	15
3.2	Laborgeräte	16
3.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
3.4	Puffer und Waschlösungen	17
3.5	Quantitative immunchemische Bestimmung von Fetuin-A und cFGF-23 im Serum (ELISA)	17
3.6	Histologische Färbungen der Gefäßpräparate	17
3.6.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	18
3.6.2	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	18
3.6.3	Nachweis der Verkalkungen mit der von Kossa-Färbung	19
3.6.4	Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase	21
3.7	Immunhistochemische Analyse der Gefäßpräparate	22
3.7.1	Protokoll der Immunhistochemie und Tabelle der verwendeten Antikörper	23
3.7.2	Immunhistochemische Doppelfärbungen	24
3.8	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	24
3.9	Protokoll der Immunogoldfärbung	25
3.10	Statistische Auswertung	25
4	Resultate	27
4.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	27
4.2	Serumkonzentrationen von Fetuin-A in Relation zu klinischen Befunden	29
4.3	Serumkonzentrationen von FGF-23 in Relation zu klinischen Befunden	31

4.4	Histomorphologische Charakterisierung der Gefäßwand	33
4.5	Immunhistochemische Charakterisierung der Gefäßwand	35
4.5.1	Nachweis von Markern der Osteo- und Chondrogenese	35
4.5.2	Expression von Fetuin-A in Relation zu glatten Gefäßmuskelzellen und Zonen chondrogener Transformation	37
4.5.3	Expression von FGF-23 in Relation zu glatten Gefäßmuskelzellen und dem FGF-23-Corezeptor Klotho	40
4.6	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an gesunder und atherosklerotischer Gefäßwand	43
4.7	Immunogoldfärbungen von Fetuin-A, smooth muscle cell actin (SMA) und FGF-23 an einem atherosklerotischen Gefäßpräparat	45
5	Diskussion	47
5.1	Risikofaktoren der Atherosklerose	47
5.2	Histomorphologische Charakterisierung der Gefäße	48
5.3	Marker der Osteo- und Chondrogenese	49
5.4	Fetuin-A	50
5.5	FGF-23	53
5.6	Fetuin-A, FGF-23 und Mineralisation	57
5.7	Kritische Betrachtung der Studie	57
6	Zusammenfassung	59
7	Thesen	61
8	Literaturverzeichnis	62
9	Danksagung	76

II Verzeichnis der Abkürzungen

ADHR	autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BMI	body mass index (kg/m ²)
BMP	bone morphogenetic protein
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CPP	Calciproteinpartikel
cFGF-23	C-terminales Fragment des Fibroblast Growth Factor-23
ECM	Extracellulärmatrix
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF-23	Fibroblast Growth Factor-23
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Hb _{A1c}	glykiertes Hämoglobin
HDL	high density lipoprotein
IHC	Immunhistochemie
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
MV	Matrixvesikel
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
oxLDL	oxidized low density lipoprotein
PBS	phosphate buffered saline
POD	Peroxidase
PTH	Parathormon
py	pack years (1 py = 365 Schachteln Zigaretten / Jahr)
SMA	smooth muscle cell actin
SOX-9	sex determining region Y-box-9
TIO	tumor induced osteomalacia
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
vK	von Kossa
VSMC	vascular smooth muscle cell

II Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Schematische Darstellung einer arteriellen Gefäßwand	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Atherogenese	4
Abb. 3:	Zusammenfassung der in der Literatur diskutierten Pathomechanismen der Gefäßverkalkung	6
Abb. 4:	Posttranslationale Modifizierungen von Fetuin-A	7
Abb. 5:	Potentielle Wege der Calciproteinpartikel (CPP)	8
Abb. 6:	Schematische Darstellung von FGF-23	10
Abb. 7:	Regulierung und Wirkung von FGF-23	11
Abb. 8:	Interaktion von FGF-23, FGF-Rezeptor (FGFR1) und Klotho	12
Abb. 9:	Klassifikation der Verkalkungen anhand der von Kossa-Färbung	20
Abb. 10:	Die Serumkonzentration von Fetuin-A in Abhängigkeit von:	
	A - dem Patientengewicht	30
	B - der Albuminkonzentration	30
	C - der Phosphatkonzentration	30
Abb. 11:	Die Serumkonzentration von cFGF-23 in Abhängigkeit von:	
	A - der Raucheranamnese (pack years)	32
	B - dem Verkalkungsgrad nach von Kossa	32
	C - der Fetuin-A Konzentration im Serum	32
Abb. 12:	Morphologie der Gefäßwand nach Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	34
Abb. 13:	Nachweis von SOX-9 und Kollagen II als Marker der Chondrogenese	36
Abb. 14:	Nachweis der Osteoklast-spezifischen Enzyme Cathepsin-K und Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP)	36
Abb. 15:	Immunhistochemischer Nachweis von Fetuin-A	37
Abb. 16:	Immunhistochemisch erfasste Expression von Fetuin-A in Relation zur:	
	A - systemischen Harnstoff-Konzentration	38
	B - systemischen HDL-Konzentration	38
Abb. 17:	Immunhistochemische Doppelfärbungen von Fetuin-A und smooth muscle cell actin (SMA) bzw. Fetuin-A und Kollagen Typ II	39
Abb. 18:	Immunhistochemischer Nachweis von FGF-23	40
Abb. 19:	Die FGF-23 Expression in der Immunhistochemie in Abhängigkeit	
	A - vom Patientenalter bei Operation	41
	B - der Zigarettenbelastung	41
	C - der HDL-Konzentration im Blut	41
Abb. 20:	Immunhistochemische Doppelfärbung von FGF-23 und smooth muscle cell actin (SMA)	42

Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis von Klotho in humaner Niere	42
Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis von Klotho und FGF-23	43
Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer makroskopisch unveränderten Gefäßwand	44
Abb. 24: Immunogoldfärbung für Fetuin-A	45
Abb. 25: Immunogoldfärbung von smooth muscle cell actin (SMA)und FGF-23	46
Tab. 1: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper	22
Tab. 2: Gewebe für Positivkontrollen	23
Tab. 3: Basisdaten, Erkrankungen und Risikofaktoren der Patienten	27
Tab. 4: Laborwerte der Patienten	28
Tab. 5: Auflistung der mit der Fetuin-A Serumkonzentration korrelierenden Parameter	29
Tab. 6: Konzentration von cFGF-23 im Serum	31
Tab. 7: Ergebnisse der Färbungen für Chondrogenese- und Osteoklastenmarker in Relation zur Verkalkungsintensität	35

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Definition der Atherosklerose

Kardiovaskuläre Gefäßerkrankungen sind ein bedeutender Morbiditäts- und Mortalitätsfaktor. Nach jahrelanger, symptomloser Progredienz kommt es durch Herzinfarkt und Schlaganfall zur akuten Symptomatik, die bis zum Tode der Patienten führen kann.

Im Jahre 2006 erlagen 43,7% aller in Deutschland verstorbenen Menschen einer Herzkreislauferkrankung (149.578 Männer und 209.375 Frauen; statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr.385 vom 21.09.2007).

Ischämische Hirninfarkte verursachen 80% der Schlaganfälle. Damit stehen sie in der Todesursachenstatistik hinter der koronaren Herzerkrankung (KHK) und malignen Erkrankungen an dritter Stelle. Atherosklerotische Gefäßveränderungen sind hierbei maßgebend.

Eine Unterscheidung zwischen den Begriffen Atherosklerose und Arteriosklerose ist in einigen Fällen sinnvoll. Intimaverkalkungen und die damit verbundene Arterienverengung (bis hin zur Okklusion) werden als Atherosklerose benannt, während die Verkalkung der Media und ihrer elastischen Fasern häufig als Arteriosklerose bezeichnet wird. Bei Letzterer kommt es mit zunehmendem Alter vorrangig zur Versteifung der Gefäßwand, aber nicht zwingend zur Lumeneinengung (Mönckeberg-Sklerose). Die Mediaverkalkung ist bei Patienten in hohem Alter, mit Niereninsuffizienz und/oder Diabetes mellitus meist zusammen mit atherosklerotischen Veränderungen zu finden, tritt aber auch singular auf¹⁻³. Die Bezeichnungen Atherosklerose und Arteriosklerose werden im deutschen Sprachraum weitestgehend synonym verwendet. In dieser Arbeit wird durchweg der Begriff „Atherosklerose“ gebraucht, da histologische Veränderungen im Mittelpunkt stehen und „Atherosklerose“ einer histologischen Beschreibung der Gefäßveränderung eher gerecht wird (gr.: athere - Mehlbrei oder Schleim; sklerose - hart).

Die Atherosklerose manifestiert sich meist multilokulär im Gefäßsystem, ist aber auf die Leitungsgefäße beschränkt. So konnten bei Patienten mit relevanter peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) in 26-50% auch eine mehr als 50%ige Lumeneinengung einer A.carotis und in 23-42% der Fälle eine zusätzliche Nierenarterienstenose nachgewiesen werden⁴.

Atherosklerose ist mit den primären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie (insbesondere dem LDL/HDL-Quotienten), Nikotinabusus und Diabetes mellitus sowie den sekundären Faktoren Adipositas, Stress, Bewegungsmangel, chronischen Entzündungszuständen und Hyperhomocysteinämie verbunden. Daneben sind konstitutionelle Risikofaktoren wie das Alter (m \geq 45 J.; w \geq 55 J.), das männliche Geschlecht und eine familiäre Belastung von Bedeutung⁵. Untersuchungen, die auf eine Beteiligung chronischer Chlamydia

pneumoniae-Infektionen an der Pathogenese der Atherosklerose hinweisen, seien hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt ⁶.

Arterien bestehen aus der Intima mit einlagigem Endothel, der von elastischen Fasern (Lamina elastica interna und externa) begrenzten Media und der Adventitia mit den Vasa vasorum (Abb. 1). Atherosklerotische Läsionen sind initial Intima-Veränderungen, die sich im weiteren Verlauf auf Media und Adventitia auswirken.

Die WHO definiert die Atherosklerose als „[...] variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“.

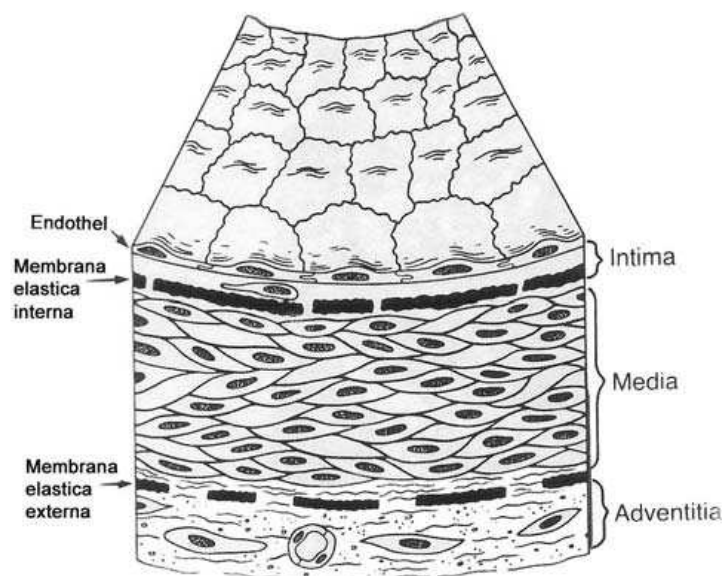


Abb. 1: Schematische Darstellung einer arteriellen Gefäßwand. (aus: ⁷)

1.1.2 Pathogenese der Plaquebildung

Diese oben genannte Definition beschreibt Läsionen, die bereits weit fortgeschritten sind. Bis dieses Stadium erreicht ist, laufen zahlreiche pathophysiologische Veränderungen ab. Gemäß der später um den Begriff der endothelialen Dysfunktion erweiterten „response to injury“-Hypothese ist die Schädigung der einlagigen Intimazellschicht Ausgangspunkt für alle nachfolgenden Veränderungen ^{7, 8}. Normalerweise wird der Stoffwechsel zwischen Blut und Media über die Endothelzellen vermittelt. Diese sind für die Synthese von pro- und antithrombogenen Faktoren, die Regulation des Gefäßtonus und die Immunmodulation, beispielsweise durch Produktion von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, verantwortlich ^{9, 10}. Die Integrität des Endothels wird hierbei durch Druckbelastungen, Nikotin, Hyperlipidämie,

immunologische Prozesse und hämodynamische Unregelmäßigkeiten (v.a. an Gefäßaufgabelungen, wie z.B. der A. carotis communis) beeinflusst. Intimaläsionen führen zur verminderten Synthese antithrombotischer Faktoren, zur Freilegung subendothelialen Bindegewebes sowie zum Einstrom von Lipoproteinen (vornehmlich LDL) und Blutzellen (v.a. Monozyten und Lymphozyten) in die Gefäßwand.

LDL-Partikel werden durch freie Radikale aus Endothelzellen und Makrophagen zu oxidiertem LDL (oxLDL), welches durch Makrophagen über den Scavenger-Rezeptor phagozytiert und intrazellulär eingelagert wird^{11, 12}. So entstehen fettbeladene Schaumzellen („foam cells“). Ansammlungen mehrerer Schaumzellen imponieren als makroskopisch sichtbare Fettstreifen („fatty streaks“) bzw. Lipidplaques. Dieses Stadium kann sich bereits bei Adoleszenten mit erniedrigten Serumkonzentrationen von HDL-Cholesterin finden. Jedoch gilt dieser Zustand als reversibel und wird daher nicht zwangsläufig als Vorstufe der Atherosklerose angesehen¹³.

Andererseits trägt oxLDL zur Aufrechterhaltung und Ausweitung atherosklerotischer Läsionen bei, da es z.B. den Einstrom weiterer Monozyten in die Intima bewirkt, die Auswanderung von Makrophagen hemmt und die Apoptose der Gefäßzellen stimuliert¹⁴.

Darüber hinaus sezernieren aktivierte Makrophagen Zytokine und Wachstumsfaktoren, die den pathologischen Prozess weiter unterhalten. Hinzu kommt durch Thrombozyten produziertes PDGF (platelet derived growth factor). Diese para- und autokrin wirkenden Proliferations- sowie Wachstumsfaktoren bewirken eine Einwanderung glatter Muskelzellen (VSMCs) von der Media in die Intima. Im gesunden Gefäß befinden sich diese Zellen in der G₀-Phase. Nach Aktivierung und Einwanderung in die Intima sezernieren sie Kollagene und Proteoglykane. Auch die klonale Expansion von VSMCs kann zum progredienten Wachstum einer fibroproliferativen Plaque beitragen. Die Vermehrung der Extrazellulärmatrix (ECM) stellt den Übergang vom Fettstreifen zur fibrösen Plaque dar. Es kann zur Anlagerung weiterer Plasmaproteine und Bildung von Fibrinthromben kommen. Diese komplexen Läsionen sind durch Zelldetritus, Lipide, Cholesterinkristalle und den fibrösen Umbau der Umgebung gekennzeichnet⁵ (Abb. 2).

Im weiteren Verlauf kann es zur Aufweichung der Plaques bzw. der Deckplatten kommen. Daran sind v.a. Matrixmetalloproteinasen (v.a. MMP 1, 2 und 9) beteiligt¹⁵. Das Aufbrechen einer Plaque kann durch den konsekutiven Kontakt zwischen thrombogenem Material und Blut zur Thrombosierung führen. Der entstandene Thrombus wird dann gegebenenfalls durch eingewanderte Mediamyozyten organisiert, indem diese Kollagene und Extrazellulärmatrix produzieren¹⁶. Der nächste Schritt in der Progression der fibrösen Plaques ist häufig die Verkalkung, die u.U. auch als „Abschluss“ dieser Umbau- und Inflammationsprozesse anzusehen ist⁵.

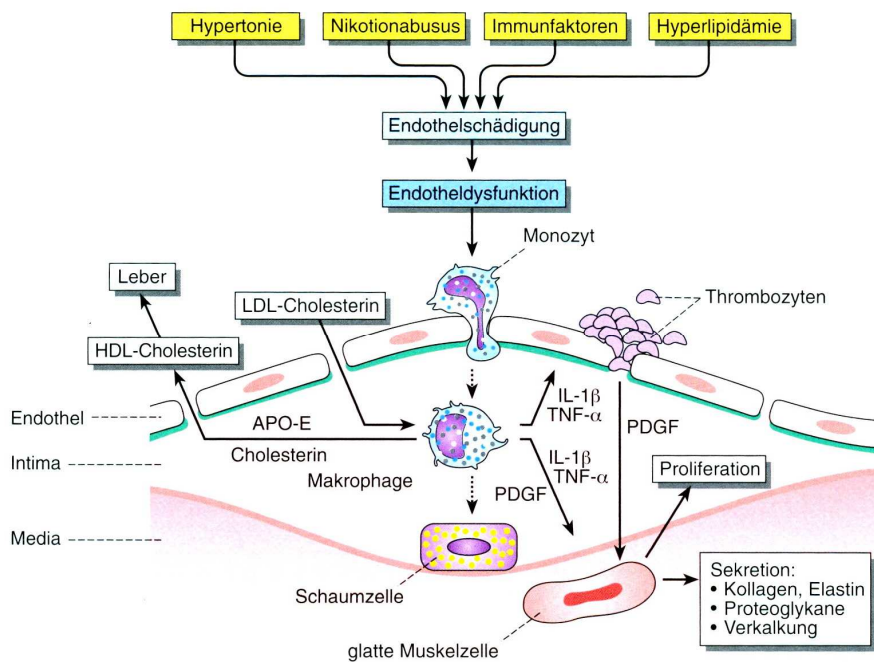


Abb. 2: Schematische Darstellung der Atherogenese. (aus: ⁵)

1.1.3 Mineralisierung der atherosklerotischen Gefäßwand

In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Kalzifizierung in atherosklerotischen Plaques ein aktiver und regulierter Prozess und keineswegs nur als passive Präzipitation von Calcium-Phosphat zu verstehen ist. Es kommt zum Zusammenspiel induzierender und inhibierender Faktoren. Hierbei weisen Mineralisationsvorgänge in Arterien, unabhängig von der Nierenfunktion, enge Verbindungen zu den physiologischen Prozessen im Knochen auf ^{2, 17-24}.

Atherosklerotische Verkalkungen finden sich vor allem in weit fortgeschrittenen Läsionen. Es werden vier zur Verkalkung führende Mechanismen postuliert ²⁵: 1.) Die Kristallisation biologischer Makromoleküle wird nicht ausreichend inhibiert. 2.) An toten Zellen und ihren Membranen bilden sich Kristallisationskeime bzw. diese Strukturen selbst wirken als Kristallisationskeime. 3.) Die Aggregate aus anti-Cholesterin-Antikörpern und Cholesterinkristallen dienen als Kristallisationskeime für die Verkalkung. 4.) In fortgeschrittenen Läsionen finden sich ähnliche bis gleiche Strukturen wie im Knochen.

Für diese vier Prozesse sind sowohl zelluläre als auch molekulare/humorale Veränderungen von Bedeutung, wobei die Hierarchie der Veränderungen noch unzureichend verstanden ist.

In gesunden Gefäßen werden apoptotische Zellen durch phagozytierende Zellen abgeräumt. Mit zunehmendem Alter erschöpft sich vermutlich die Phagozytosekapazität der Makro-

phagen. Atherogen wirkt sich an dieser Stelle auch ein Mangel an HDL aus, in dessen Folge es zu einem insuffizienten reversen Cholesterintransport zur Leber kommt.

Die Frage nach der Herkunft der Zellen, die in Gefäßen einer osteoblastenartigen Differenzierung unterliegen und mineralisierte Matrix produzieren, ist noch nicht eindeutig beantwortet. Diskutiert werden die Einwanderung mesenchymaler und/oder die Differenzierung ortsständiger, ehemals ruhender Stammzellen¹⁹.

Sehr wahrscheinlich ist aber die Beteiligung von Gefäßmuskelzellen (VSMCs), welche durch die Freisetzung/Produktion von Matrixvesikeln (MVs) und Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“) sowie durch chondro- bzw. osteogene Transdifferenzierungen zur Verkalkung beitragen. Die von VSMCs generierten Matrixvesikel und „apoptotic bodies“ sind Initiatoren der Kalzifizierungen. Während Apoptosekörperchen eher in zugrunde gehendem Gewebe als Kristallisationskeime dystropher Verkalkungen zu finden sind, stellen extrazelluläre MVs im Knochen physiologische Produkte von Chondrozyten und Osteoblasten dar, an denen die ossäre Mineralisation startet¹⁹. Die an den Außenseiten der MVs befindlichen Annexine II, V und VI dienen als Calciumkanäle zur Erhöhung der vesikulären Calciumkonzentration und als Bindungsstellen für Kollagen II und X der ossären ECM²⁶. Zudem bewirkt die alkalische Phosphatase (AP) aus den Vesikeln eine erhöhte lokale Phosphatkonzentration. Eine ausreichende Menge von Ionen und die geeignete Verkalkungsmatrix sind so für die erfolgreiche Kristallbildung im Knochen vorhanden²⁵ (und dort zitierte Referenzen),²⁷.

Auch in atherosklerotischen Läsionen wurden solche Vesikel gefunden^{28,29}. In vitro konnten isolierte Vesikel zur Verkalkung angeregt werden³⁰. An der Außenseite von Apoptosekörperchen kommt es durch Präzipitation von Calcium-Phosphaten ebenfalls zu Kalzifizierungen. Der vorangehende Schritt, die Apoptose selbst, wird durch pro-inflammatorische Mediatoren eingeleitet (Fas, pro-apoptotische Zytokine, TNF, oxLDL, reactive oxygen species - ROS)²⁵ (und dort zitierte Referenzen).

Die Umwandlung der VSMCs zu osteogenen bzw. chondrogenen Zellen, welche dann spezifische osteo- und chondrogene Transkriptionsfaktoren wie z.B. Runx-2 (runt-related transcription factor-2; früher bekannt als Cbfa1 - core binding factor antigen-1) und „sex determining region Y-box-9“ (SOX-9) exprimieren, erfolgt auf spezifische Reize. Hier werden als mögliche Faktoren beispielsweise „Bone morphogenetic protein-2 und 6“ (BMP-2 und 6) angesehen, da sie an den VSMCs unter anderem zu einer verminderten Expression von „smooth muscle cell antigen“ (SMA), einem spezifischen Protein kontraktiver Gefäßzellen, führen³¹. Auch die intrazelluläre Speicherung von Lipiden oder oxLDL kann VSMCs zur Produktion chondro- bzw. osteogener Proteine anregen, die letztlich eine Kalzifizierung initiieren^{32,33}.

Erhöhte Konzentrationen von Phosphat- und Calciumionen können mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls diese Dedifferenzierung induzieren. Phosphationen werden hierbei

über den Natrium-abhängigen Symport via Pit-1 Transporter nach intrazellulär befördert, wo sie die mRNA-Expression für Osteogenesemarker (Osteocalcin und Cbfa-1) aktivieren^{34, 35}.

In-vitro Untersuchungen an VSMCs haben gezeigt, dass supraphysiologische Calciumkonzentrationen, wie sie z.B. infolge von Entzündungen und Apoptose auch im Atherom auftreten, die Expression des Pit-1 Transporters stimulieren. So wird das Expressionsmuster der VSMCs in Richtung Chondroblasten und Osteoblasten verschoben und es kommt zur vermehrten Freisetzung und Verkalkung von Matrixvesikeln. Gleichzeitig wird aber die Synthese von Matrix-Gla-Protein (MGP) stimuliert, welches wiederum, zumindest in der gamma-carboxylierten Form, zu den Kalzifizierungsinhibitoren gezählt wird^{36,37}. Diese Mechanismen sind schematisch in *Abb. 3* zusammengefasst.

Neben zellulären Aspekten haben molekulare/humorale Veränderungen einen wichtigen Einfluss auf das Entstehen und die Weiterentwicklung von Verkalkungen in atherosklerotischen Läsionen. Hierbei sind in den letzten Jahren die beiden Proteine Fetuin-A und Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) ins Zentrum der Betrachtungen gerückt.

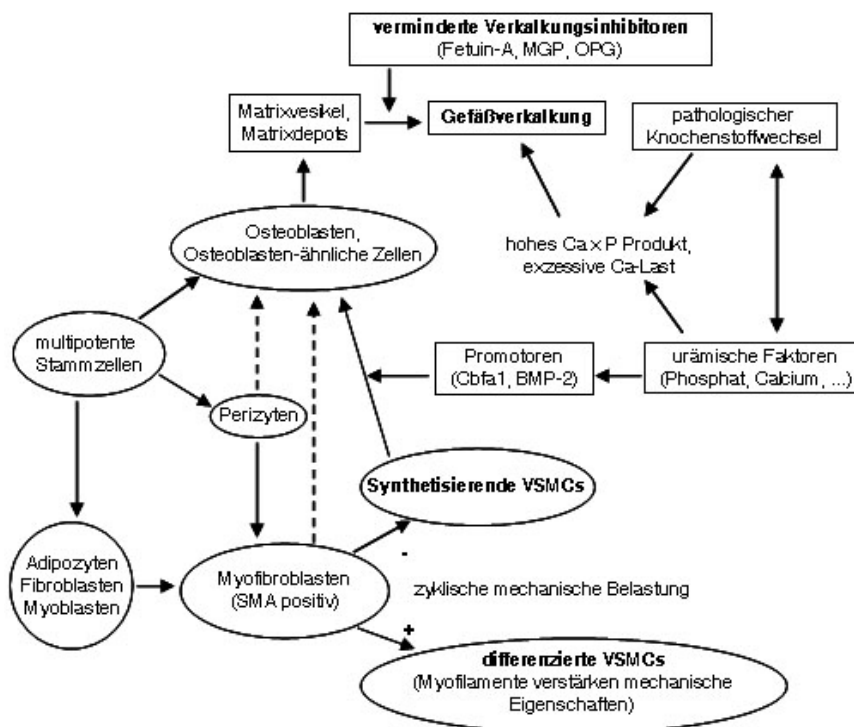


Abb. 3: Zusammenfassung der in der Literatur diskutierten Pathomechanismen der Gefäßverkalkung. (modifiziert nach³⁸)

Gestrichelte Linien stellen hypothetische Zusammenhänge dar.

MGP - Matrix-Gla-Protein, OPG - Osteoprotegerin, Cbfa1 - core binding factor α -1

(Für die Mediaverkalkung werden zusätzlich andere Mechanismen postuliert. Hier ist beispielsweise das bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) von zentraler Bedeutung³⁹.)

1.2 Struktur und Funktion von Fetuin-A

Bei Fetuin-A (alpha2-Heremans-Schmid Glykoprotein - AHSG) handelt es sich um ein saures Serumprotein aus 349 Aminosäuren (AS). Zusammen mit Fetuin-B, Kininogen und dem Histidin-reichen Glykoprotein gehört es zur Cystatin-C Superfamilie der Cystein Protease Inhibitoren (Abb. 4). Fetuin-A wird vorrangig von Hepatozyten synthetisiert und ist im Knochen und in Zähnen zu finden, den Organen der physiologischen Mineralisation⁴⁰.

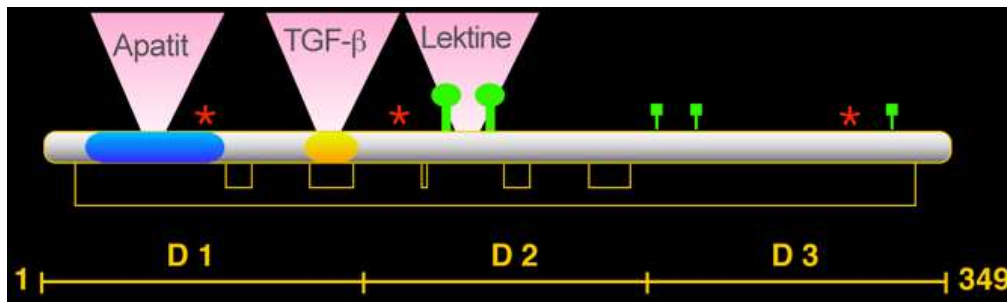


Abb. 4: Posttranslationale Modifizierungen von Fetuin-A.

D1-D3 sind die drei Domänen des Proteins (D1 AS 5-115; D2 AS 126-230; D3 AS 230-349). Die gelben Verbindungslinien stellen Disulfidbrücken dar, die für die Cystatin-ähnlichen Domänen D1 und D2 charakteristisch sind. Serin-Phosphorylierungsstellen sind mit einem roten Stern versehen. N-Glykosylierungsstellen sind mit einem großen, O-Glykosylierungsstellen mit einem kleinen grünen Symbol markiert. Die Bindungsstellen für Hydroxyapatit, für TGF- β (transforming growth factor- β) und für Lektine sind ebenfalls angegeben. (aus: www.biointerface.rwth-aachen.de)

Fetuin-A ist zum einen negativer Reaktand der akuten-Phase-Antwort, spielt aber v.a. im Insulin-Stoffwechsel und beim Transport von Calcium und Phosphat eine wichtige Rolle. Einerseits komplexiert Fetuin-A Calcium- und Phosphationen und verhindert so die Präzipitation basischer Calciumphosphate, andererseits werden auf diese Weise Calcium- und Phosphationen zu den Orten der Mineralisierung (Knochen und Zähne) transportiert³⁹⁻⁴². In diesem Zusammenhang wird Fetuin-A auch als „Chaperon“ für Calcium-Phosphate bezeichnet⁴³. Im Serum tragen Fetuin-A und Albumin etwa zu gleichen Teilen zur Inhibition von Verkalkungen bei. Die kolloidalen Gebilde aus amorphem Calciumphosphat und Fetuin-A (u.a. noch durch Albumin stabilisiert) werden auch calciprotein particles (CPPs) genannt (Abb. 5). Sie haben einen Durchmesser von 25 bis 150nm und aggregieren nicht⁴⁴. Daher wird Fetuin-A auch als Puffer bezeichnet, der extraossäre Verkalkungen verhindert⁴⁵.

Dem kürzlich vorgeschlagenen Modell der „Verkalkung durch Ausschluss von Inhibitoren“ („mineralization by inhibitor exclusion“) zufolge spielt Fetuin-A auch am Orte der Mineralisation eine entscheidende Rolle. Fetuin-A ist zu groß, um zwischen die Kollagenfibrillen zu gelangen, kann aber das gebundene Calciumphosphat in den Zwischenraum abgeben. Calcium-Phosphat-Kristalle in der richtigen Größe können zwischen die Fibrillen gelangen und das dort befindliche Wasser ersetzen. Außerhalb der Fibrillen verhindert Fetuin-A die Entstehung großer Apatitkristalle^{46,47}.

Fetuin-A^(-/-) Mäuse entwickeln bei Calcium- und Vitamin D-reicher Diät ausgeprägte Verkalkungen in Niere, Herz, Hoden, Lunge, Haut und Gefäßsystem^{48,49}.

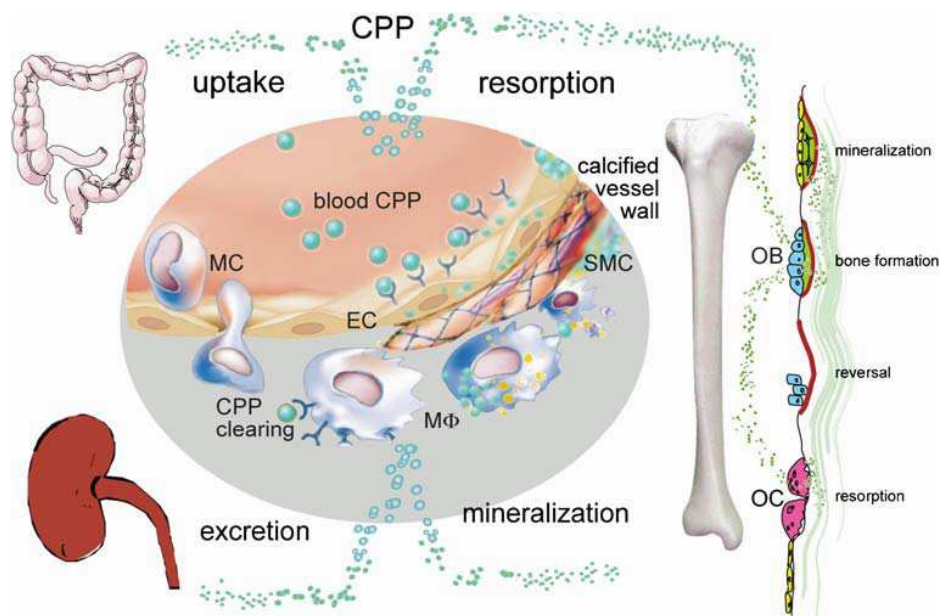


Abb. 5: Potentielle Wege der Calciproteinpartikel (CPP).

Fetuin-A stabilisiert die zirkulierenden Partikel und sorgt für eine effiziente Aufnahme. CPP könnten physiologisch im Blut und im Knochen bei der Osteoklasten (OC)-vermittelten Knochenresorption entstehen. Im Knochen stünden die Partikel sogleich für Osteoblasten (OB) zur Verfügung. Bei Störungen des Calcium-Phosphat-Haushaltes kann es zur Bildung zahlreicher CPP kommen, die Fetuin-A vermehrt binden. Monozyten (MC) oder Makrophagen (MΦ) phagozytieren interstitiell-gelagerte CPP. Zu viele Partikel führen bei Endothelzellen (EC), Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) zum programmierten Zelltod. Andere modulierende Kalzifizierungsinhibitoren fehlen in dieser Darstellung (aus: ⁴³)

Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz werden häufig sowohl ausgeprägte Verkalkungen als auch erniedrigte Fetuin-A-Spiegel beschrieben. Damit verbunden ist eine erhöhte Mortalität, welche v.a. auf Verkalkungen von Koronararterien und Herzklappen beruht⁵⁰⁻⁵³. Auch hier ist die Endotheldysfunktion, bedingt u.a. durch die chronische Urämie, die chronische Inflammation und den renalen Hypertonus, Ausgangspunkt atherosklerotischer Läsionen mit und ohne Mediaverkalkung. Zur Verkalkung der Media tragen zudem Störungen des Calcium-Phosphat-Haushaltes im Rahmen der renalen Osteopathie bei (chronic kidney disease - metabolic bone disease). Zusätzlich kommt es durch die Konzentrationsabnahme physiologischer Inhibitoren wie z.B. Fetuin-A oder Matrix-Gla-Protein wahrscheinlich zur Präzipitation von Hydroxyapatit in den Gefäßwänden⁵⁴⁻⁵⁶.

Zwischen Nierengesunden und Patienten, die unter einer milden Einschränkung der Nierenfunktion leiden, finden sich noch keine Fetuin-A-Konzentrationsunterschiede⁵⁷. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sind die Fetuin-A-Konzentrationen stark erniedrigt, steigen aber nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder an⁵⁸.

Eine metabolische Bedeutung kommt Fetuin-A zu, da es die Tyrosinkinase des Insulinrezeptors in Leber und Skelettmuskulatur hemmt^{59,60}. Durch die fehlende Autophosphorylierung wird der mitogene Signalweg des Insulinrezeptors inhibiert⁶¹. An Fetuin-A^(-/-) Mäusen und solchen mit einer Mutation im Fetuin-A-Gen konnte zudem gezeigt werden, dass die Sensitivität des Insulinrezeptors und damit die Glukose-Clearance erhöht ist. Es kommt zur verminderten Gewichtszunahme und zur Optimierung des Lipidstatus^{62,63}. Weitere Untersuchungen im Rahmen der „Heart and Soul“-Studie zeigten unabhängige positive Korrelationen zwischen der Fetuin-A-Konzentration im Blut und dem Auftreten eines metabolischen Syndroms (Kriterien: Hüftumfang, Triglyceride, HDL-Cholesterin, Blutdruck, Glucose-Nüchternwert)⁶⁴.

1.3 Struktur und Funktion des Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23)

Phosphor zirkuliert im Körper entweder als freies (anorganisches) oder als gebundenes (organisches) Phosphat und wird u.a. für den Energiehaushalt, die Nukleinsäuresynthese und die Mineralisation benötigt⁶⁵. Zusammen mit Calcium ist es Hauptbestandteil der anorganischen Knochenmatrix. Die Homöostase von Calcium und Phosphat wird durch das Zusammenspiel von Darm, Knochen und Niere bestimmt. Die Konzentration von zirkulierendem Calcium wird durch Vitamin D, Thyreocalcitonin und Parathormon (PTH) reguliert. Erst in den letzten Jahren wurden die Mechanismen der Phosphatregulation verstärkt untersucht. Die Aufnahme von Phosphat geschieht über intestinale NaPi2b-Transporter. Für das Phosphatgleichgewicht ist zudem das Verhältnis von Resorption und Mineralisation in den Knochen wichtig, da diese den größten Phosphatspeicher des Körpers darstellen.

Entscheidend für die Phosphathomöostase ist aber v.a. die Niere. In den Nierenglomeruli wird Phosphat fast vollständig filtrierte, um dann im Urin eine annähernd gleiche Konzentration wie im Plasma zu haben^{66, 67}. Waren bislang Vitamin D und PTH Gegenstand intensiver Forschung, so hat sich FGF-23 in den letzten Jahren als weitere wichtige Stellgröße herauskristallisiert (Abb. 6).

Mutationen von FGF-23 wurden als Ursache der tumorassoziierten Osteomalazie (TIO)⁶⁸ und der autosomal dominanten hypophosphatämischen Rachitis (ADHR)⁶⁹ nachgewiesen. Bei hypophosphatämischen TIO-Patienten wurde FGF-23, zusammen mit secreted frizzled related protein-4 (sFRP-4), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) und FGF-7, als stärkstes Phosphatonin identifiziert⁷⁰⁻⁷².

Das Protein besteht aus 251 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 30-32 kDa. Biologisch aktiv ist offenbar nur das intakte Molekül⁷³. FGF-23 wird in osteogenen Zellen gebildet. In Femur, Schädelknochen und Zähnen von Ratten ist es vor allem in jungen Osteo- und Odontoblasten sowie abgeschwächt in Osteozyten, Osteoklasten und Chondrozyten zu finden^{74, 75}.

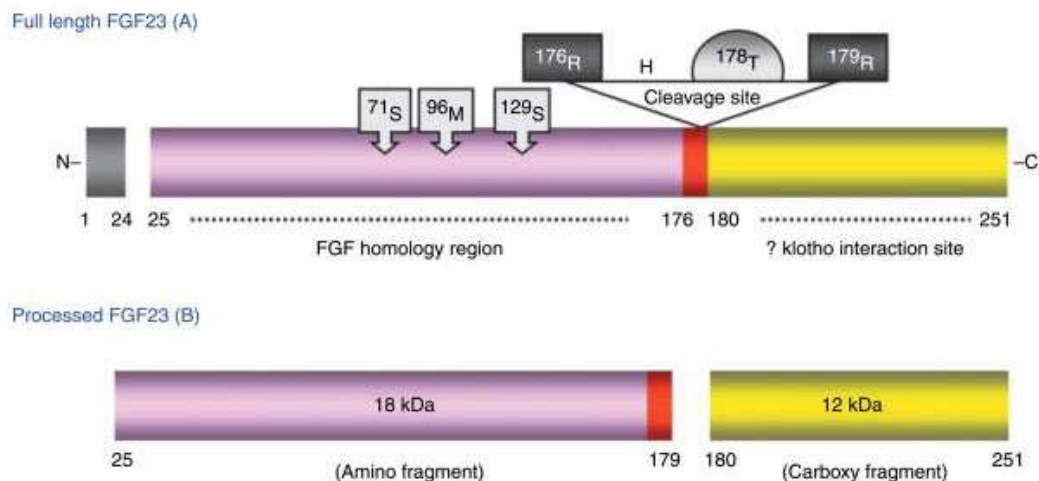


Abb. 6: Schematische Darstellung von FGF-23.

Das Signalpeptid (AS 1–24), der amino-terminale, FGF-homologe Anteil (AS 25–179) und das carboxy-terminale Ende von FGF-23 (AS 180–251) sind dargestellt. An der Spaltungsstelle (AS 176–179) wird das Protein in zwei Fragmente geteilt.

Die eingezeichneten Mutationen ¹⁷⁶R und ¹⁷⁹R gehören zur ADHR. Die Mutationen an ⁷¹S, ⁹⁶M, und ¹²⁹S sind ursächlich bei Patienten mit FTC (familial tumoral calcinosis). ¹⁷⁸T ist die Stelle für die O-Glykosylierung. (modifiziert nach⁷⁶)

FGF-23 hemmt die für die Rückresorption von Phosphat verantwortlichen Natrium-Phosphat-Co-Transporter NaPi2a und NaPi2c in den proximalen Nierentubuli^{24, 76}. So bewirkt intravenös oder intraperitoneal verabreichtes rekombinantes FGF-23 bei Mäusen eine Phosphaturie und Hypophosphatämie^{68, 77}. Bei transgenen, FGF-23 überexprimierenden Mäusen kommt es ebenfalls zur Hypophosphatämie und zu Rachitis^{70, 71, 78}.

Zudem hemmt FGF-23 die Expression der 1- α Hydroxylase und verhindert so die Bildung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (Calcitriol) (Abb. 7). Dadurch wird die intestinale Phosphatresorption gesenkt. Hierbei scheint eine hormonelle Rückkopplung zu bestehen, da die FGF-23-Produktion durch Vitamin D induziert wird^{77, 79, 80}.

Eine phosphatlastige Diät über mehrere Tage erhöht die FGF-23-Konzentration im Blut, kurzfristige Änderungen (z.B. eine einmalige phosphatlastige Mahlzeit) scheinen keinen Einfluss zu haben⁸¹⁻⁸³.

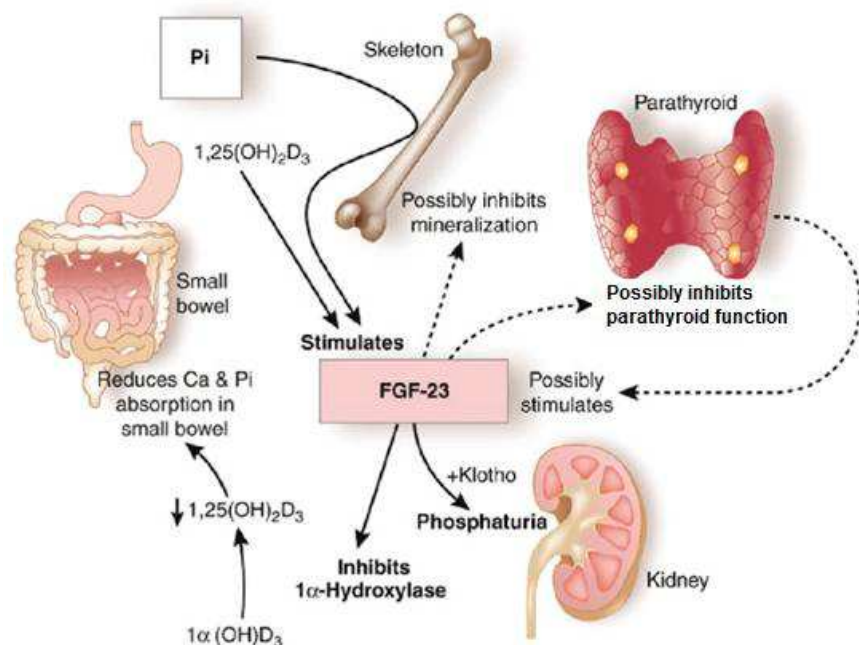


Abb. 7: Regulierung und Wirkung von FGF-23.

FGF-23-Freisetzung aus Osteozyten und Osteoblasten durch hohe Phosphatspiegel und/oder 1,25(OH)₂-Vitamin D₃. Die bekanntesten Wirkungen von FGF-23 sind eine Phosphaturie durch renale NaPi-Cotransporter-Inhibition und Hemmung der 1- α Hydroxylase. Die reduzierten Vitamin D-Spiegel haben eine verminderte gastrointestinale Aufnahme von Phosphat und Calcium zur Folge. (modifiziert nach⁸⁴)

Über die Interaktion zwischen FGF-23 und PTH wird kontrovers diskutiert. Initial scheint FGF-23 PTH zu hemmen. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist wahrscheinlich

die Empfindlichkeit der Nebenschilddrüsen gegenüber FGF-23 herabgesetzt und es kommt zur Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus mit Konzentrationsanstiegen von FGF-23 und PTH. Allerdings stimuliert PTH im Gegensatz zu FGF-23 die Synthese von Vitamin D in der Niere und aktiviert Phosphat-freisetzende Osteoklasten.

Bei chronischen Nierenerkrankungen ist die Hyperphosphatämie einer der entscheidenden Risikofaktoren für die Morbidität und Mortalität⁸⁵. Um ihr entgegenzuwirken, kommt es in den verbleibenden Nephronen zur FGF-23-vermittelten Suppression der NaPi-Cotransporter und zur Hemmung der Vitamin D-Synthese. Die FGF-23-Konzentrationen steigen bei diesen Patienten mit fallender glomerulärer Filtrationsrate (GFR) an, um dann bei hämodialysepflichtigen Patienten ein Vielfaches der Werte von Nierengesunden zu erreichen. Die FGF-23-Spiegel korrelieren hierbei positiv mit der Creatinin-, Phosphat-, Calcium- und Parathormonkonzentration im Blut sowie der Dauer der vorausgegangenen Nierenersatztherapie⁸⁶⁻⁸⁸.

Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1) ist der spezifische Rezeptor von FGF-23. Die Gabe von FGF-23 bei FGFR-1^(-/-) Mäusen hat keinen Effekt auf die gemessene Phosphatkonzentration oder die NaPi2a- und NaPi2c-Expression in den Tubuli^{89, 90}. Die FGF-Rezeptoren (FGFR-1-4) haben eine intrinsische Protein-Tyrosinkinase-Aktivität und modulieren Zellproliferation und -Differenzierung⁹¹⁻⁹³.

Ebenso wie FGF-15, -19 und -21 benötigt auch FGF-23 neben der Bindung an den FGFR-1 zusätzlich noch die Interaktion mit einem spezifischen Kofaktor. Für den FGF-23-FGFR-1-Komplex übernimmt das Protein Klotho diese Aufgabe^{94, 95} (Abb. 8).

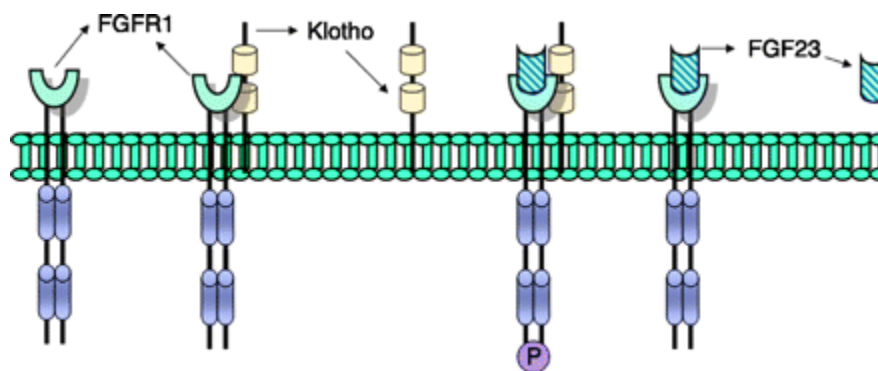


Abb. 8: Interaktion von FGF-23, FGF-Rezeptor (FGFR1) und Klotho.

Klotho wird für die Signalweitergabe benötigt (modifiziert nach⁷⁶).

Die FGF-23-Konzentration in Klotho^(-/-) Mäusen ist bis zu 2000-fach erhöht, was dafür spricht, dass die FGF-23-Signalweitergabe ohne den Co-Rezeptor Klotho kaum oder nicht

möglich ist und somit die phosphaturische Wirkung fehlt⁹⁶⁻⁹⁸. Phänotypisch sind FGF-23^(-/-) und Klotho^(-/-) Mäuse identisch. Beide Spezies sind durch eine verkürzte Lebenserwartung, Infertilität, Atherosklerose, Weichteilverkalkung von Haut, Lunge, Hoden und Herz, Hyperphosphatämie und erhöhte Vitamin D-Konzentrationen gekennzeichnet^{99, 100}.

Das Produkt des Klotho-Gens ist eine einfach-transmembranöse β -Glucuronidase (1014 AS, 130 kDa) mit kurzem intrazellulären Carboxy-terminalen Anteil, Transmembrandomäne und der extrazellulären Region aus zwei homologen Ketten KL1 und KL2. Klotho wird in Zellen der distalen Nierentubuli und im Choroidplexus gebildet.

Die extrazelluläre Domäne kann nach Abspaltung von der Zellmembranoberfläche (ectodomain shedding) abgegeben und in Blut, Urin und Liquor nachgewiesen werden. Die beiden Formen des Proteins haben unterschiedliche Funktionen. Während membranständiges Klotho als Co-Rezeptor für FGF-23 und FGFR-1 dient, wirkt die sezernierte Form als humoraler Faktor. Diese Form von Klotho sorgt beispielsweise durch Inhibition der Internalisierung von Calciumkanälen für einen erhöhten Calciumeinstrom in die Nierenzelle und hat durch inhibitorische Wirkung auf die Insulin/IGF-1 Aktivität eine endokrine Funktion^{94, 101, 102}.

In Nierengewebe von Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Klotho durch FGF-23 im Sinne einer negativen Rückkopplung inhibiert wird¹⁰³.

2 Ziel der Arbeit

Die mit klassischer Atherosklerose assoziierten Verkalkungen der Intima und die bevorzugt bei chronischer Niereninsuffizienz und mit steigendem Alter auftretenden Media-Verkalkungen weisen sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene Parallelen mit der enchondralen und membranösen Knochenbildung sowie den dazugehörigen Umbauprozessen auf.

Fetuin-A und der Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) sind zwei wichtige Mediatoren der orthotopen und ektopen Mineralisation. Fetuin-A verhindert als Trägerprotein für Calciumphosphat die Bildung unlöslicher Calciumphosphate in der Zirkulation und sorgt gleichzeitig für den Transport dieser Verbindungen zu den Orten der Mineralisation. FGF-23 ist weniger als ein Wachstumsfaktor, sondern vielmehr als ein Hormon anzusehen und bildet mit Vitamin D und Parathormon den Regelkreis für die Calcium- und Phosphathomöostase. Beide Proteine wurden bislang im wesentlichen im Rahmen der für eine chronische Niereninsuffizienz typischen Aberrationen im Calcium- und Phosphatstoffwechsel betrachtet und mit atherosklerotischen Veränderungen bei diesen Patienten in Verbindung gebracht.

Ob und in welchem Maße diese Proteine auch bei der „klassischen“ Atherosklerose eine Rolle spielen, ist noch weitestgehend ungeklärt und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Hierzu wurden bei Patienten, die sich einer Carotisendarterektomie unterzogen haben, die Konzentrationen von Fetuin-A und FGF-23 im Blut untersucht. Es sollte geprüft werden, ob bei Patienten mit „klassischer“ Atherosklerose und physiologischer Nierenfunktion zwischen den systemischen Konzentrationen von Fetuin-A und FGF-23 einerseits und zwischen diesen Parametern und klinischen Charakteristika der Patienten andererseits ein Zusammenhang besteht.

Parallel dazu sollten die Gefäßpräparate morphologisch und immunhistochemisch charakterisiert werden. Hierbei waren das Ausmaß der Verkalkung in Relation zu chondrogener bzw. osteogener Transformation der Gefäßwand wesentliche Parameter. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Fetuin-A, FGF-23 und als der für die FGF-23 induzierte Signaltransduktion unverzichtbare Co-Rezeptor Klotho in den Operationspräparaten nachweisbar sind.

3 Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden im Rahmen der Studie:

„Charakterisierung der Mineralablagerungen in arteriellen Gefäßen bei Patienten mit „klassischer“ und Urämie-assoziiertes Atherosklerose“ (EK: A34/2007)

durchgeführt und durch Mittel des Forun-Programms der Universität Rostock gefördert.

In die Studie wurden Patienten, die einwilligungsfähig waren und ein schriftliches Einverständnis zur Untersuchung gegeben hatten, eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren eine eingeschränkte Einsichtsfähigkeit, fehlende Einwilligung und chronisch infektiöse Erkrankungen.

3.1 Studienablauf

Es handelt sich bei den Studienteilnehmern um Patienten, die sich in der Abteilung für Gefäßchirurgie der Universität Rostock (Leitung: Prof. Dr. med. W. Schareck, kommissarisch: PD Dr. med. C. Bünger) einer Carotisendarterektomie unterzogen haben.

Studienaufklärung und Anamneseerhebung erfolgten postoperativ am Krankenbett, wenn ein Operationspräparat asserviert werden konnte. Zwischen September 2007 und Juli 2009 wurden 80 Patienten eingeschlossen. Alle Patienten wurden postoperativ über Pathogenese und Risikofaktoren der Atherosklerose sowie Ziel und Ablauf der Studie informiert. Die Anamnese zielte vor allem auf das derzeitige Krankheitsgeschehen (symptomatische/asymptomatische Stenose), atherosklerotische Risikofaktoren, Nebenerkrankungen und Medikamenteneinnahme. Im Zuge der Anamneseerhebung erfolgte auch die Blutentnahme. Die Auflistung der Diagnosen stützt sich auf die Erkrankungs- und Medikamentenanamnese, Arztbriefe und Akten sowie aktuelle Laborwerte. Die Werte für die im Rahmen der üblichen Patientenversorgung im Routinelabor gemessenen Parameter wurden den Akten entnommen.

Die Medikation mit Statinen wurde als Hinweis auf eine Störung des Fettstoffwechsels gewertet. Um den Einfluss des Rauchens zu untersuchen, wurden die Studienteilnehmer hinsichtlich der pack years (py) und des zeitlichen Verlaufs ihres Nikotinkonsums klassifiziert. Es wurde hierbei zwischen Nichtrauchern, Rauchern, die mindestens 10 Jahre vor Operation das Rauchen eingestellt haben und aktiven Rauchern unterschieden.

Das postoperativ gewonnene Blut wurde bei 4°C mit 2500 U/min (1000g) für 15 min zentrifugiert. Serum wurde abgehoben, aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Alle Operationspräparate wurden in Formalin fixiert. Ein je ca. 5mm dicker, proximal der Bifurkation zur A. carotis interna und externa entnommener Querschnitt wurde im Institut für Pathologie (Direktoren: Prof. em. Dr. med. H. Nizze, jetzt: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler) in Paraffin eingebettet. Für die morphologischen Untersuchungen dienten repräsentative, 4-5µm dünne Schnitte der Präparate.

3.2 Laborgeräte

Die Präparate wurden an einem Mikroskop der Firma Leica aus Wetzlar (Typ: DMI 4000) mit digitalen Kameras (DFC 320 R2 sowie DFC 350 Fx) und korrespondierender Software (Leica Application Suite) beurteilt. Die ELISA wurden mit einem Mikrotiterplatten-Photometer der Firma Tecan aus Crailsheim (Typ: Tecan-Reader Infinite M 200) und korrespondierender Software (Magellan) ausgewertet.

3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

AppliChem GmbH, D-64291 Darmstadt

Naphtol AS-Mix Phosphat, Triton X 100, Tween 20

Aurion Immuno Gold Reagents & Accessories, 6702 AA Wageningen Niederlande

10%iges BSA-c (acetyliertes bovines Serumalbumin),

Gold-konjugierte Esel-anti-Ziege-IgG-Antikörper (H&L), (DAG-90602/2), Durchmesser der Goldpartikel: 15nm

Biochrom AG, D-12247 Berlin

0,5%ige Trypsin-/ 0,2%ige EDTA-Lösung

Carl Roth GmbH Co. KG, D-76185 Karlsruhe

Eosin G (0,5%)

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

Mayers Hämalaun (gebrauchsfertig), Orange G, Säurefuchsin, Weigerts Eisenhämatoxylin, Eindeckmittel: Aquatex und Entellan

Menzel GmbH & Co. KG, D-38116 Braunschweig

Objektträger Superfrost Plus und Deckgläschen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim

Azophloxin, Di-aminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) in Tablettenform (10mg/Tbl.), Fast Red Violett LB-Salt, Lichtgrün, Ponceau Xylidine

Die Grundchemikalien stammten im Allgemeinen von den Firmen Merck KgaA oder Carl Roth GmbH & Co. KG und hatten mindestens p.a.- Qualität.

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Wasseraufbereitung mit Ionenaustauscher Typ Destillo 20).

3.4 Puffer und Waschlösungen

Citratpuffer:

0,1M Citronensäure-Monohydrat und 0,1M tri-Natriumcitrat-Dihydrat gegeneinander bis pH 6,0 titriert

Tris buffered saline (TBS, 5x Stammlösung):

0,1M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 1,5M NaCl; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

Entwicklungspuffer für die Färbung mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern:

20 ml TBS (1x); 10mg DAB; 6,4µl H₂O₂ (30%)

Phosphate buffered saline (PBS) nach Gibco (ohne Ca², ohne Mg²):

2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 138 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O.

Der Puffer wurde gebrauchsfertig bezogen.

Waschlösungen für die Immunhistochemie:

PBS (1x) + Tween 20 (0,01%), (v/v)

PBS (1x) + Triton X 100 (0,01%), (v/v)

3.5 Quantitative immunchemische Bestimmung von Fetuin-A und cFGF-23 im Serum (ELISA)

Fetuin-A und cFGF 23 wurden im Serum quantitativ mit kommerziellen ELISAs bestimmt. Beide Tests verwenden einen an der Festphase (Mikrotiterplatte) gebundenen Fängerantikörper und einen zweiten, Biotin-markierten Detektionsantikörper (Sandwich-Technik). Mithilfe der ebenfalls im Kit vorhandenen Standards wurde eine Standardkurve erstellt und Bestimmungen wurden generell doppelt angesetzt. Die Übereinstimmung beider Messungen lag im Allgemeinen bei mindestens 90%. Der ELISA-Kit für humanes Fetuin-A stammte von Epitope Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA; der Kit für humanen cFGF war von Immutopics Inc., San Clemente, CA, USA. Die Anpassung der Standardkurve für Fetuin-A erfolgte als „point to point-regression“; für cFGF-23 wurde eine 4-parametrische Anpassung nach Levenberg-Marquardt durchgeführt. Dafür wurde in beiden Fällen die Software „Magellan“ (Tecan) verwendet.

3.6 Histologische Färbungen der Präparate

Vor der histologischen Färbung wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert (2x10 min), in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100%, 96%, 80%, 70% je 2 min) und in A. dest gestellt (5 min). Die Protokolle orientierten sich an den in der Pathologie üblichen Verfahren¹⁰⁴.

3.6.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) diente sowohl zur Übersichts- und Orientierungsfärbung als auch zur Gegenfärbung bei der von Kossa-Färbung und der Immunhistochemie.

Protokoll:

1. Mayers Hämalaun (6 min)
2. Bläuen unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser (10 min)
3. Eosin G-Lösung (0,1%; 3 min)
4. Spülen in A. dest
5. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, je kurz eintauchen)
6. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
7. Entwässern mit Xylol (10 min) und Eindecken mit Entellan (Abzug)

3.6.2 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Um eine exaktere Differenzierung und Kontrastierung der bindegewebigen Anteile in den Gefäßwänden zu erhalten, wurde die sukzedane Masson-Goldner-Trichrom-Färbung eingesetzt. Die glatte Muskulatur der Wand (VSMCs) erscheint blassrot mit dunklen Zellkernen, während sich Kollagene blaugrün anfärben.

Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner beruht auf drei Lösungen:

1) Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung: (250 ml Ansatz)

25 ml Masson-Lösung (siehe unten)

5 ml Azophloxin-Lösung (0,5 g Azophloxin ad 100 ml A. dest + 2 ml konz. Essigsäure)

220 ml 0,2%ige Essigsäure

2) Phosphormolybdän / Orange G- Färbelösung:

6 g Phosphomolybdänsäure ad 100 ml A. dest.

4 g Orange-G ad 100 ml A. dest.

3) Lichtgrün-Färbelösung:

0,25 g Lichtgrün ad 250 ml 0,2%ige Essigsäure

Masson- Färbelösung:

Lösung A: 1g Säurefuchsin ad 100ml A.dest, 1 ml konz. Essigsäure

Lösung B: 2 g Ponceau de Xylidine ad 200 ml A. dest., 2 ml konz. Essigsäure

1 Teil Lösung A + 2 Teile Lösung B

Protokoll:

1. Weigerts Eisenhämatoxylin (4,5 min)
2. Spülen in A. dest
3. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (15 min)
4. Spülen mit 1%iger Essigsäure (2 Färbeküvetten)
5. Phosphormolybdänsäure / Orange G (8 min)
6. Spülen mit 1%iger Essigsäure (2 Färbeküvetten)
7. Lichtgrün (25 min)
8. Spülen mit 1%iger Essigsäure (in 2. Färbeküvette 5 min stehen lassen)
9. Rasch entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
10. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
11. Entwässern mit Xylol (10 min) und Eindecken mit Entellan (Abzug)

3.6.3 Nachweis der Verkalkungen mit der von Kossa-Färbung

Gefäßverkalkungen werden durch die Reaktion mit Silbernitrat sichtbar gemacht (Methode nach von Kossa). An den verkalkten Bereichen werden Silberionen durch Hydrogencarbonat unter Lichteinwirkung zu metallischem Silber reduziert. Anschließend erfolgen die Fixierung und das Auswaschen überschüssiger freier Silberionen durch Natriumthiosulfat. Die verkalkten Areale erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung braun bis schwarzsilbrig-glänzend.

Protokoll:

Silberfärbung:

1. Silbernitrat-Lösung (5%) unter starkem Lichteinfluss (Tischlampe 100 W; 60 min)
2. Spülen in A. dest (3x30 sec)
3. Natriumthiosulfat-Lösung (5%; 5 min)
4. Waschen unter fließendem Leitungswasser
5. Spülen in A.dest

Gegenfärbung (HE):

6. Mayer Hämalaun (6 min)
7. Bläuen unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser (10 min)
8. Eosin (3 min)
9. Spülen in A. dest
10. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, je kurz eintauchen)
11. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
12. Entwässern mit Xylol (10 min) und Eindecken mit Entellan

Zur Bewertung der Schnitte wurde ein experimenteller, semiquantitativer Score von 0-4 angewendet (Abb. 9). In der Auswertung wurden zudem gering verkalkte ($vK1$ und $vK2 = vK+$) und stark verkalkte Präparate (mit mindestens einer großen Läsion / Kalkscholle) ($vK3$ und $vK4 = vK++$) gegenüber gestellt.

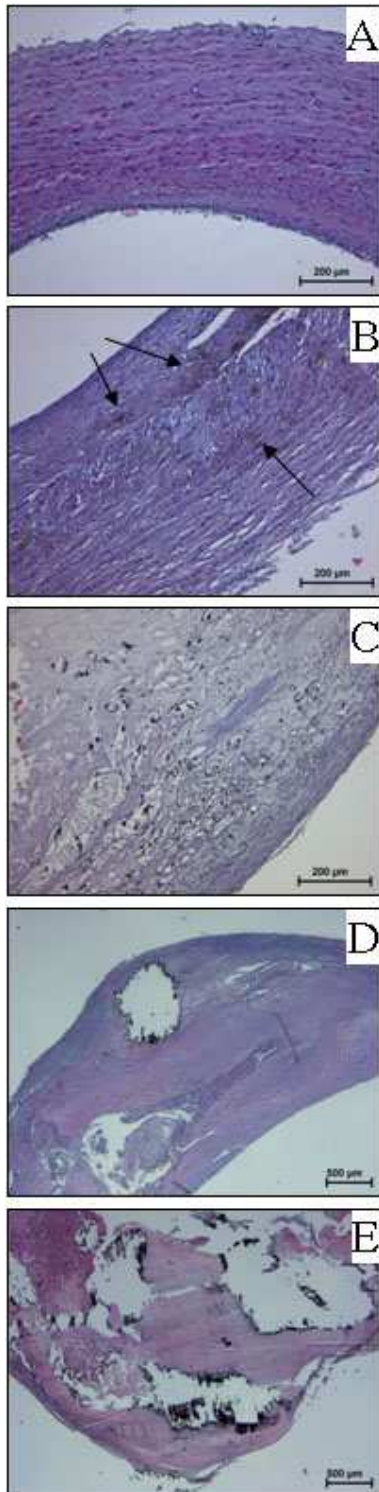


Abb. 9: Repräsentative Einteilung des Verkalkungsgrades Natives Gefäß (A), puderartige Verteilung (Pfeile) der Verkalkungen ($vK1$; B), konfluierende Läsionen ($vK2$; C), eine destruiierende Läsion ($vK3$; D) und die völlige Durchsetzung der Gefäßwand mit destruiierenden Kalkschollen ($vK4$; E)¹⁰⁵
(Vergrößerung: A,B,C: 100x; D,E: 25x)

vK-Score

- (0) Keine Verkalkungen
- (1) Puderartig fein verteilte Verkalkung („shotgun calcification“)
- (2) Konfluierende puderähnliche Läsionen
- (3) Puderähnliche Verkalkungen *plus* mindestens eine große destruierende Läsion
- (4) Ubiquitäre Verteilung morphologisch unterschiedlicher Verkalkungen *plus* zwei oder mehr destruierende Läsionen

Die Bewertung der Schnitte erfolgte unabhängig durch zwei Untersucher. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Beurteilungen beider Betrachter betrug 0,80. Unterschiedlich bewertete Präparate wurden ein weiteres Mal gemeinsam evaluiert.

3.6.4 Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein Schlüsselenzym reifer Osteoklasten. Im Knochen wird sie, ebenso wie Cathepsin-K, in die geschlossenen Kompartimente der Howship-Lakunen geschleust, um dort Gewebe abzubauen.

Diese Färbung soll ebenso wie die Immunhistochemie (IHC) mit Antikörpern gegen Cathepsin-K Osteoklasten-artige, multinukleäre Zellen in den Gefäßwänden identifizieren.

Färbelösung:

200 ml TRAP-Puffer

(40mM Natriumacetat und 10 mM Natriumtartrat-Dihydrat mit HCl auf pH 5,0 eingestellt)

2 ml Triton X 100

4 ml N-N-Dimethylformamid

240 mg Fast Red Violett LB-Salz

40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat

Protokoll:

1. TRAP-Puffer (10 min, 37°C)
2. TRAP-Färbelösung (2 h, 37°C)
3. A. dest (5 min)
4. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (1 min)
5. Spülen mit Leitungswasser (3 min), Bläuen (10 min)
6. Eindecken mit Aquatex

Die Auswertung der TRAP-Färbung erfolgte analog zu den von Kossa-Färbungen mit dem Unterschied, dass die Präparate ausschließlich als positiv oder negativ kategorisiert wurden.

Bei Auftreten rot angefärbter Zellen (idealerweise multinukleär) wurde das Präparat als positiv gewertet.

3.7 Immunhistochemische Analyse der Gefäßpräparate

Vor immunhistochemischer Färbung wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert (2x15 min), in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100%, 96% je 10 min; 80%, 70% je 5 min) und in A. dest gestellt (5 min).

Da es bei der Formalinfixierung und Paraffineinbettung zur Quervernetzung vieler antigener Strukturen kommt, werden diese für eine immunhistochemische Färbung durch Enzym- und/oder Wärmebehandlung wieder zugänglich gemacht. Dabei sind die angewendeten Techniken (limitierte enzymatische Degradation, saure oder alkalische Hitzebehandlung) antikörper- und/oder antigenspezifisch. Zum Nachweis von Kollagen Typ II wurde Trypsin (Konz. 0,2%) bei 37°C für 15 min eingesetzt. Bei allen anderen Färbungen diente die Wärmebehandlung in der Mikrowelle mit Citratpuffer (pH 6,0) der Demaskierung.

Zur Detektion gebundener Primärantikörper (*Tab. 1*) wurden Biotin-konjugierte Esel-anti-Ziege-IgG Antikörper (Verdünnung 1:1000; Dianova, Hamburg) oder bispezifische biotinkonjugierte Pferde-anti-Maus / anti-Kaninchen-IgG-Antikörper eingesetzt.

Tab. 1: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Firma und Kat.-Nr.	Spezifität	Titer
SOX-9	Ziegen- Antiserum	Santa Cruz BT; sc-17340	N-Terminus	1:300
Kollagen II	Ziegen-Antiserum	Santa Cruz BT; sc-7764	N-Terminus	1:300
Kollagen II	Kaninchen-Antiserum	AbD Serotec; 2150-0060	Kollagen II	1:300
Cathepsin-K	Kaninchen-Antiserum	Abcam; ab 19027	C-term. Region	1:400
Fetuin-A	Ziegen-Antiserum	R&D Systems; AF-1184	Fetuin-A	1:500
FGF-23	Ziegen-Antiserum	Santa Cruz BT; sc-27249	interne Region	1:150
Klotho	Ziegen-Antiserum	Santa Cruz BT; sc-22220	interne Region	1:150
SMA	Maus-IgG; Klon 1A4	DakoCytomation; M0851	N-Terminus	1:500

Zum Nachweis der gebundenen Antikörper und zur Signalverstärkung diente ein mit Meerrettich-Peroxidase (POD) oder alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter Avidin/Biotin-Komplex (Vector® Laboratories, Inc.; Burlingame, USA), (Substrat für POD: DAB, bräunliche Färbung; Substrat für AP: Vector Red).

Bei jeder Färbung wurde eine Positivkontrolle, also ein Gewebe, welches das nachzuweisende Ag sicher enthält, mitgeführt (*Tab. 2*). Bei der Negativkontrolle wurde entweder

der Erstantikörper durch Blockierserum ersetzt oder dem verdünnten Erstantikörper ein von diesem Antikörper spezifisch erkanntes Peptid (Blocking Peptide) zugefügt.

Die Auswertung der Präparate im Hinblick auf angefärbte Strukturen und deren Lokalisation erfolgte unabhängig durch zwei Betrachter. Die Beurteilung der Färbungen wurde dokumentiert und für eine statistische Auswertung kodiert. Bei unterschiedlicher Bewertung der Färbungen wurden die Präparate diskutiert und ein Konsens herbeigeführt.

Tab. 2: Gewebe für Positivkontrollen

Antikörper	Positivkontrolle
SOX-9	Rattentrachea (Knorpel) und humanes Chondrosarkom
Kollagen II	Rattentrachea (Knorpel) und humanes Chondrosarkom
Cathepsin K	humaner Knochen (entkalkt)
Fetuin-A	humane Leber und Knochen
FGF-23	humaner Knochen (entkalkt)
Klotho	humane Niere
SMA	native arterielle Gefäßwand

3.7.1 Protokoll der Immunhistochemie und Tabelle der verwendeten Antikörper

1. Blockieren der endogenen Peroxidase in 1%igem H₂O₂
 - 20 min; nur bei Verwendung von POD als Detektionssystem
2. A. dest (5 min)
3. Antigendemaskierung mit Citratpuffer
 - 3x8 min, bzw. 3x2 min bei 450 W, dazwischen jeweils 5 min Pause
4. Abkühlen (10 min)
5. Spülen in PBS (5 min)
6. Umranden der Präparate auf dem Objektträger mit Fettstift
7. Blockieren unspezifischer Reaktionen mit 1%igem Blockierserum
 - 40 min in feuchter Kammer bei Raumtemperatur
8. Blockierserum ablaufen lassen
9. Inkubation mit Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (*Tab. 1*)
 - entweder 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer
10. Spülen in PBS (2x5 min)
11. Inkubation mit geeignet verdünntem Biotin-konjugiertem Zweitantikörper
 - 45 min bei Raumtemperatur

12. Spülen in PBS (2x5 min)
13. Inkubation mit Enzym-konjugiertem Avidin/Biotin-Komplex
 - Avidin-Biotin-Peroxidase (POD) oder Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase (AP)
 - 30 min bei Raumtemperatur
14. Spülen in PBS (2x5 min)
15. Inkubation mit Substrat
 - 3 min DAB bei POD-Färbung; 25 min Vector® Red bei AP-Färbung
16. Spülen in PBS (5 min)
17. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun (45 sec)
18. Spülen mit Leitungswasser (3 min), Bläuen (10 min)
19. Eindecken mit Aquatex

3.7.2 Immunhistochemische Doppelfärbungen

Um die Verteilung von Fetuin-A relativ zu SMA und Kollagen II sowie die Verteilung von FGF-23 relativ zu SMA im Gewebe genauer zu analysieren, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Erst erfolgte die AP-Färbung bis auf die Gegenfärbung mit HE, anschließend wurde das zweite Antigen mittels POD-Färbung detektiert. Für die simultane Darstellung von Fetuin-A und SMA, von Fetuin-A und Kollagen II sowie von FGF-23 und SMA wurden jeweils sieben gut erhaltene Präparate ausgewählt, in denen die genannten Proteine schon in den Einzelfärbungen gut nachweisbar gewesen waren.

3.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um ein atherosklerotisches Präparat der A. carotis für die Elektronenmikroskopie zu erhalten und aufbereiten zu können, wurde die Aufnahme in die Studie mit dem Patienten bereits präoperativ besprochen. Nach Etablierung der erforderlichen Techniken für die Probenbehandlung erfolgte die Auswahl des Patienten zufällig. Das Operationspräparat wurde direkt in das Zentrum für Elektronenmikroskopie (Direktoren: Prof. em. Dr. rer. nat. L. Jonas, jetzt: Dr. rer. nat. M. Laue) gebracht. Dort wurden aus der Gefäßwand ca. 5 mm³ messende Stückchen herauspräpariert, fixiert und in LR-White-Kunstharz eingebettet. Nach lichtmikroskopischer Begutachtung von Semidünnschnitten wurde das Präparat getrimmt und auf einen informativen Bezirk (weniger als 1 mm²) reduziert. Dann wurden Ultradünnschnitte hergestellt (Schnittdicke zwischen 60 und 80 nm).

Für die Evaluierung einer nahezu unveränderten Arterienwand stand ein kleines, während einer Nierenspende (Lebendspende) in der Urologischen Universitätsklinik Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. O. Hakenberg) entnommenes Gefäßstück zur Verfügung. Dieses Material wurde ebenfalls fixiert und in Araldit eingebettet, jedoch nur zur morphologischen Begutachtung und nicht für die Immunogold-Färbung eingesetzt. Für die Beurteilung der

Präparate konnte das Transmissionselektronenmikroskop Zeiss Libra 120 mit korrespondierender WinTEM-Software genutzt werden.

Die Verdünnungen der Erstantikörper sind im Vergleich zur Immunhistochemie im Allgemeinen um den Faktor 10 geringer. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte folgendermaßen: Fetuin-A: Verdünnung = 1:25, 1h bei Raumtemperatur; FGF-23: Verdünnung = 1:15, 72h bei 4°C, SMA: Verdünnung = 1:50, 72h bei 4°C. Bei den Negativkontrollen wurde der Erstantikörper weggelassen. Der Gold-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:30 verdünnt.

Die benutzten Chemikalien und Waschlösungen waren, ebenso wie die Pipettenspitzen, steril, um bakterielle Kontamination zu vermeiden.

3.9 Protokoll der Immunogoldfärbung

1. Waschen in PBS (1x)
 - 1 h bei Raumtemperatur
2. Reduzieren der Aldehydgruppen mit 0,1%igem $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Borax) in PBS (1x)
 - 1 h bei Raumtemperatur
3. Waschen in PBS (1x5 min)
4. Blockieren unspezifischer Reaktionen mit 5%igem Blockierserum
 - 30 min bei Raumtemperatur, feuchte Kammer
5. Waschen in Inkubationspuffer, (PBS (1x) mit 0,2% BSA-c; 3x5 min)
6. Inkubation mit Erstantikörper
 - ca. 50 μl je Grid
7. Waschen mit Inkubationspuffer (6x5 min)
8. Inkubation mit einem korrespondierenden Gold-konjugierten Zweitantikörper
 - 2 h bei Raumtemperatur
9. Waschen mit Inkubationspuffer (6x5 min)
10. Waschen in PBS (3x5 min)
11. Waschen in sterilem H_2O d.d. (2x5 min)
12. Trocknen

3.10 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 15.0 durchgeführt.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test. Da die Mehrzahl der Parameter nicht normalverteilt waren, wurde der Ranksummentest nach Spearman und die multiple Regressionsanalyse für die Korrelationsanalyse genutzt (bei Normalverteilung – Pearson). Hinsichtlich der Probenmorphologie und der Laborwerte war es bei einigen Parametern hilfreich, sie in Gruppen einzuteilen. Für die Gruppenvergleiche

dienten χ^2 -Test, Fishers exact t-Test, Mann-Whitney-U Test (bei 2 Gruppen) und Kruskal-Wallis-Test (bei mehr als 2 Gruppen). Da sich im Hinblick auf Fetuin-A Serumkonzentration mehrere korrelierende Parameter fanden, konnte hier eine multiple Regressionsrechnung durchgeführt werden. Unterschiede wurden ab $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

4 Resultate

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Mehrzahl der Patienten (28 Männer und 22 Frauen) wurde operiert, weil bei ihnen innerhalb von 4 Wochen vor Operation eine Stenose der A. carotis communis oder interna klinisch relevant wurde. Die Charakteristika der Studienteilnehmer sind in *Tab. 3* und die Laborwerte der Patienten peri- bzw. postoperativ in *Tab. 4* zusammengefasst.

Tab. 3: Basisdaten, Erkrankungen und Risikofaktoren der Patienten

(n = 80; 50 Männer und 30 Frauen)

Basisdaten	Median (Spannweite)
Alter, Jahre	70 (43-95)
Männer	69 (46-81)
Frauen	72 (43-95)
Gewicht, kg	
Männer	80 (62-111)
Frauen	72,5 (47-122)
BMI, kg/m ²	
Männer	26,6 (20,7-34,2)
Frauen	26,1 (16,9-47,7)
BMI > 30 kg/m ²	9M / 9F
BMI > 40 kg/m ²	0M / 3F
Erkrankungen/Risikofaktoren	Anzahl (Männer/Frauen)
Diabetes mellitus	21 (13/8)
Geringgradig eingeschränkte Nierenfunktion* (CNI Grad I-III)	19 (14/5)
KHK / pAVK	38 (26/12)
Arterielle Hypertonie	70 (44/26)
Statin-Therapie	56 (32/24)
Positive Raucher-Anamnese	49 (40/9)

*KDOQI-Guidelines, 2003¹⁰⁶

Die Bandbreite der Symptome war immens. So waren leichte kognitive Beschwerden, Amaurosis fugax, TIA (transitorische ischämische Attacken) und PRIND (prolongiertes

reversibles ischämisches neurologisches Defizit) sowie sensomotorischen Hemiparesen als Folgen der Gefäßveränderungen zu verzeichnen. Die übrigen Patienten (22 Männer und 8 Frauen) unterzogen sich der Operation, bevor die atherosklerotischen Veränderungen klinisch relevant wurden.

Neun der Diabetes mellitus-Patienten waren insulinpflichtig, die mediane Erkrankungsdauer betrug 14,7 Jahre und der mediane HbA1c Wert lag bei 6,8% (5,2-11,6%). Die mediane Serumkonzentration von Kreatinin betrug bei 19 Patienten mit mäßiger Einschränkung der Nierenfunktion (CNI Grad I-III) 130 µmol/l (Männer) und 129 µmol/l (Frauen), die mediane Harnstoffkonzentration betrug 8,83 mmol/l. Unter den 49 Patienten mit positiver Raucheranamnese fanden sich 24 aktive Raucher mit einer pack year-Belastung von 40,7 J. Die übrigen Patienten mit einer durchschnittlichen pack year-Belastung von 17,2 J. hatten mindestens 10 Jahre vor dem operativen Eingriff mit dem Rauchen aufgehört.

Tab. 4: Laborwerte der Patienten

Laborwerte	Median (Spannweite)	Referenzbereich
Kreatinin		
Männer	87,1 (55,7-292,0)	62-106 µmol/l
Frauen	69,6 (37,7-199,0)	35-88 µmol/l
Harnstoff	4,6 (1,4-25,8)	2,9-7,1 mmol/l
Cholesterol	4,0 (1,9-7,9)	< 6,18 mmol/l
HDL		
Männer	1,05 (0,65-1,86)	0,91-2,06 mmol/l
Frauen	1,19 (0,69-2,38)	1,09-2,28 mmol/l
LDL	2,36 (1,0-5,57)	1,76-4,11 mmol/l
LDL/HDL Quotient	2,31 (0,82-6,30)	
Triglyceride	1,48 (0,70-6,74)	< 2,33 mmol/l
Lipoprotein (a)*	0,20 (0,02-1,90)	< 0,3 g/l
Calcium	2,28 (1,80-3,70)	2,20-2,55 mmol/l
Phosphat	0,94 (0,50-1,44)	0,78-1,53 mmol/l
Protein, total	66 (51-85)	65-85 g/l
Albumin	34 (26-46)	35-48 g/l
CrP präoperativ	3 (1-88)	< 5 mg/l
CrP postoperativ	22 (1-119)	< 5 mg/l

* 30 Patienten hatten eine LP(a) Konzentration > 0,3 g/l

4.2 Serumkonzentrationen von Fetuin-A in Relation zu klinischen Befunden

Die mediane Konzentration von Fetuin-A betrug 0,389 g/l und die Werte sind innerhalb der Patientengruppe normalverteilt. Der Minimalwert in der Gruppe ist 0,196 g/l, der Maximalwert 0,646 g/l. Signifikante Korrelationen nach Spearman und nach Berechnung der schrittweisen multiplen Regression sind in *Tab. 5* aufgeführt. Die Zusammenhänge zwischen den Serumkonzentrationen von Fetuin-A und dem Patientengewicht, der Albuminkonzentration und der Phosphatkonzentration im Serum sind in *Abb. 10* dargestellt.

Die Konzentration von Fetuin-A ist bei Patienten mit Diabetes mellitus (M=0,404 g/l) höher als in der übrigen Gruppe (M=0,377 g/l). Allerdings ist dies nur ein Trend und statistisch nicht signifikant. Die Serumkonzentration von Fetuin-A bei Patienten mit einem BMI > 35 kg/m² (n=4) beträgt im Mittel 0,470 g/l.

Die mediane Fetuin-A Serumkonzentration der Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (n=19) ist mit der der Gesamtgruppe annähernd identisch (M_{CNI}=0,384 g/l und M=0,391 g/l). Eine Assoziation zwischen der Serumkonzentration und der immunhistochemischen Ausprägung der Fetuin-A Färbung findet sich nicht (r=-0,144; p=0,202).

Tab. 5: Auflistung der mit der Fetuin-A-Serumkonzentration korrelierenden Parameter

Parameter	Korrelation (Spearman)		multiple Regression	r ²
	r	p		
Albumin (g/l)	0,301	< 0,01	1. Modell	0,161
Phosphat (mmol/l)	0,242	< 0,05	2. Modell	0,280
Gewicht (kg)	0,344	< 0,01	3. Modell	0,368
Hämatokrit	0,342	< 0,01		
BMI (kg/m ²)	0,296	< 0,01		
CaxP-Produkt	0,275	< 0,05		
GFR (ml/min)	0,232	< 0,05		
CrP präoperativ (mg/l)	-0,260	< 0,05		
AP (U/l)	-0,257	< 0,05		
cFGF-23 (RU/ml)	-0,232	< 0,05		

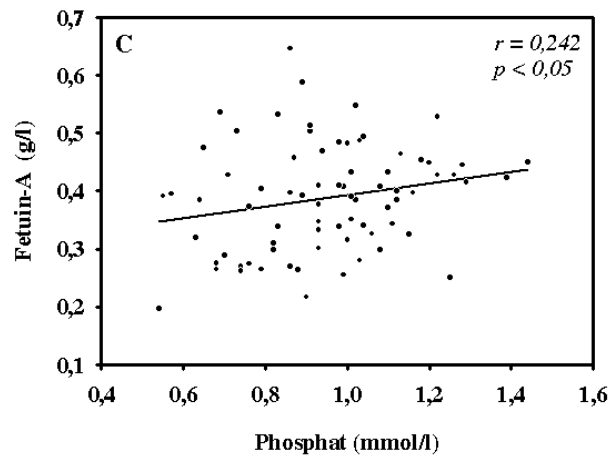
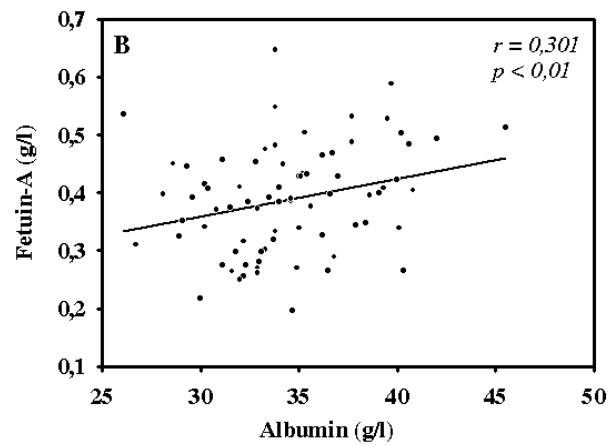
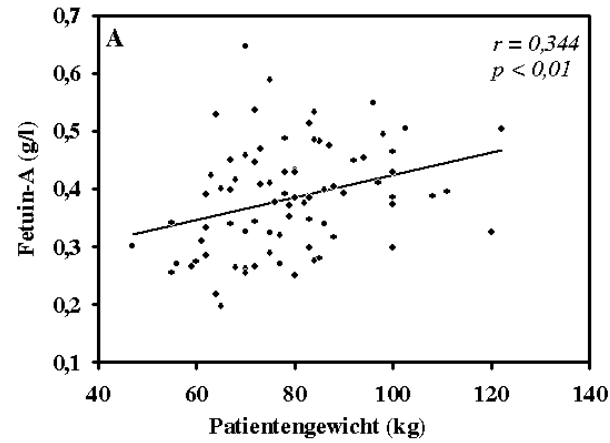


Abb. 10: Die Fetuin-A-Konzentration im Serum in Abhängigkeit vom Patientengewicht (A) und der Albumin- (B) sowie der Phosphatkonzentration (C) im Serum.

4.3 Serumkonzentrationen von FGF-23 in Relation zu klinischen Befunden

Dieser ELISA erfasst sowohl das C-terminale Fragment als auch das intakte FGF-23-Molekül. Allgemein gültige Referenzwerte für diesen Parameter bestehen noch nicht. Uns standen Assays der ersten und zweiten Generation zur Verfügung, bei denen die untere Nachweisgrenze mit 5 RU/ml angegeben ist.

In 30 Blutproben konnten keine cFGF-23-Konzentrationen gemessen werden. In einer Probe* betrug die Konzentration mehr als 1500 RU/ml. Da 1500 RU/ml die obere Grenze des Messbereiches ist und uns zu wenig Material zur Verfügung stand, um die Bestimmung mit einer stärkeren Verdünnung der Probe zu wiederholen, wurde dieser Wert in der Auswertung eingesetzt. Die nächsthöchste Konzentration in unserem Kollektiv betrug 402 RU/ml.

Tab. 6: Konzentration von cFGF-23 im Serum

cFGF-23 Konzentration	alle Proben (n=80)	Konzentration >5 RU/ml (n=50)	Konzentration >5 RU/ml (n=49)*
M (RU/ml)	26	85	83
$x \pm SD$ (RU/ml)	80 ± 177	125 ± 213	97 ± 77

*Nach Ausschluss des Wertes mit ≥ 1500 RU/ml

Diese Blutprobe gehört zu einer 80-jährigen Patientin, die neben der Atherosklerose der A. carotis noch einen Herzschrittmacher bei Arrhythmia absoluta, eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung Grad II-III, polyarthrotische Beschwerden und eine Radiojodtherapie bei multifokaler Schilddrüsenautonomie in ihrer Krankengeschichte zu verzeichnen hat. Die Phosphatkonzentration im Serum der Patientin war leicht erniedrigt (0,68mmol/l; Referenz: 0,78-1,53 mmol/l) und der Kreatininwert leicht erhöht (95,1 μ mol/l; Referenz: 39-91 μ mol/l). Die restlichen Laborwerte waren unauffällig.

In der statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse einerseits metrisch betrachtet (Spearman Ranksumentest), andererseits nach Aufteilung in 2 Gruppen. Hierbei wurden alle Patienten mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze (n=30) mit denen verglichen, die Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze aufwiesen (n=50).

Zwischen der Raucheranamnese (py-Belastung) und der cFGF-23-Konzentration im Serum fand sich eine positive Korrelation (Abb. 11A). Des weiteren fanden sich bei Patienten mit höheren cFGF-23-Konzentrationen tendenziell stärker verkalkte Präparate (vK++) und niedrigere Fetuin-A-Serumkonzentrationen (MWU-Test) als bei Patienten mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 11B und 11C).

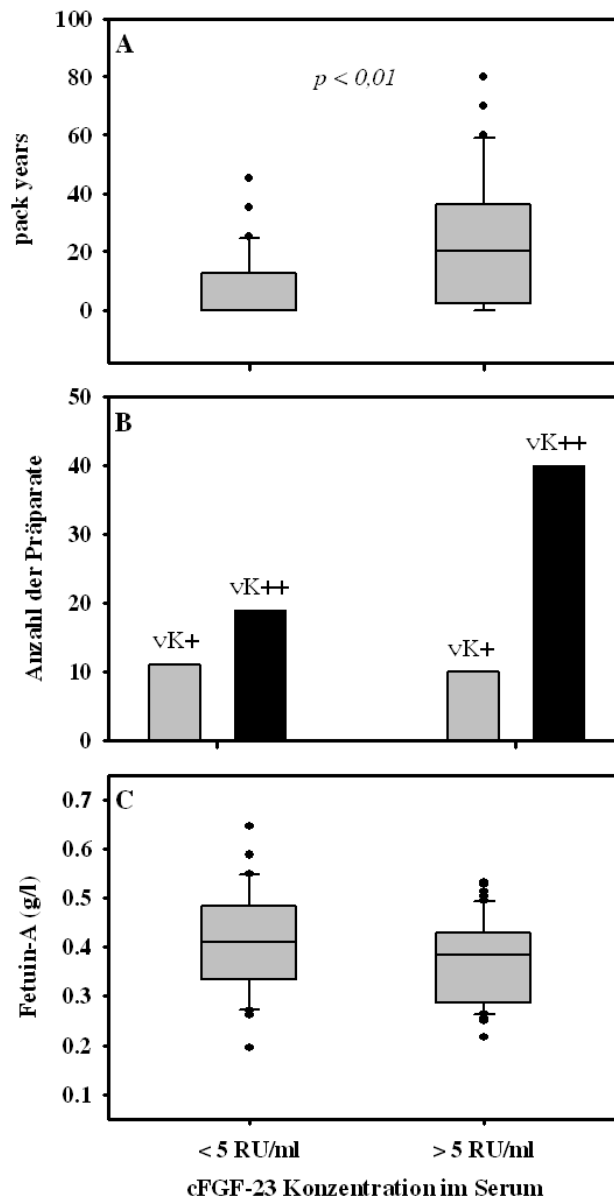


Abb. 11: Die cFGF-23-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von der Zigarettenbelastung (py) (A), dem Verkalkungsgrad (B) und der Fetuin-A Konzentration im Serum (C). Es wurden Proben mit Konzentrationen unterhalb ($n=30$) und oberhalb ($n=50$) der Nachweisgrenze miteinander verglichen. Hierbei ist lediglich die Assoziation zur Zigarettenbelastung signifikant. Zwischen der cFGF-23 Konzentration und dem Verkalkungsgrad der Präparate besteht tendenziell eine positive Korrelation.

Die Verbindung zwischen der Fetuin-A- und der cFGF-23-Serumkonzentration ist signifikant, wenn sie mit der Korrelation nach Spearman berechnet wird. Sie ist es nicht, wenn der MWU-Test zum Vergleich der beiden cFGF-23 Gruppen bezüglich ihrer Fetuin-A-Konzentration herangezogen wird.

4.4 Histomorphologische Charakterisierung der Gefäßwand

In allen Operationspräparaten, die mittels der Masson-Goldner-Methode gefärbt wurden, fanden sich im Umbau befindliche Areale. Allerdings variierte das Ausmaß dieser Veränderungen recht stark. Lediglich in 6 Präparaten war die Anfärbung von glatten Muskelzellen dominant, ein histologisch vollständig nativer Wandaufbau war allerdings in keinem der Gefäße zu finden.

Die überwiegend grüne Anfärbung bestätigt den ausgeprägten bindegewebigen Umbau der zumeist verdickten Gefäßwände. Die glatten Muskelzellen, welche in nativen Gefäßen den Hauptbestandteil der Media darstellen, waren teilweise völlig durch zellarmes Bindegewebe ersetzt.

Abb. 12 zeigt den Verlauf der bindegewebigen Veränderungen vom gesunden zum stark umgebauten Gefäß.

Die Färbung nach von Kossa konnte in allen Präparaten (n=80) verkalkte Areale der unterschiedlichsten Ausprägung nachweisen. Lediglich puderartige, fein verstreute Verkalkungen fanden sich in 5 Präparaten (vK1). In 16 Präparaten bildeten mehrere solcher Herde größere Ansammlungen (vK2). Die Mehrzahl der Präparate (n=40) zeigte mindestens eine Verkalkungsläsion, bei der die Schichten der Gefäßwand auseinandergedrängt waren (vK3). In 19 der nach von Kossa gefärbten Präparate fanden sich massive Verkalkungen und Destruktionen (vK4). Hier war eine Zuordnung der Gefäßschichten kaum noch möglich.

Die vereinfachende Zusammenfassung geringgradig verkalkter Präparate (vK1 und vK2) zu vK+ einerseits und deutlich bis stark verkalkter Präparate (vK3 und vK4) zu vK++ andererseits ergab ein Verhältnis von 21 (vK+) zu 59 (vK++).

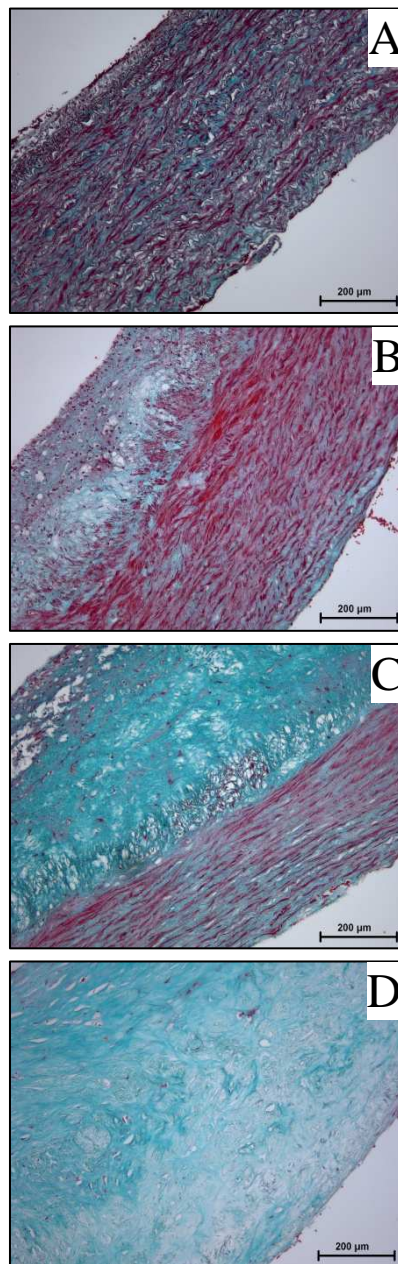


Abb. 12: Morphologie der Gefäßwand nach Masson-Goldner-Trichromfärbung.

Die typische Morphologie für eine native Gefäßwand mit regulär angeordneten Gefäßmuskelzellen und diskreter ECM (A), eine Gefäßwand mit geordneter Media und bereits verdickter Intima (B), ein Abschnitt mit dünner Media und zellarmer bindegewebiger Intima (C) und eine fast zellfreie Gefäßwand, bei der eine Unterscheidung zwischen Intima und Media nicht mehr möglich ist (D), sind zu sehen. (Vergrößerung: A-D: 100x)

4.5 Immunhistochemische Charakterisierung der Gefäßwand

4.5.1 Nachweis von Markern der Osteo- und Chondrogenese

Zum Nachweis der Chondrogenese wurden Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor SOX-9 und das für Chondrozyten spezifische Kollagen Typ II verwendet.

Die zur Positivkontrolle herangezogenen Gewebe (Rattentrachea und humanes Chondrosarkom) zeigten eine eindeutige intrazelluläre Anfärbung der Chondrozyten für SOX-9. Auch bei der Kollagen II-Färbung waren interzelluläre/extrazelluläre Signale in den Knorpelspannen der Rattentrachea (nicht gezeigt) und im Chondrosarkom zu finden (*Tab. 7 und Abb. 13*).

Cathepsin-K und TRAP dienten der Identifizierung von Osteoklasten bzw. Osteoklastenartigen, multinukleären Zellen, wie sie typischerweise mit diesem Antikörper (Cathepsin-K) bzw. mit dieser Färbung (TRAP) im Knochen angefärbt werden können (ossäre Positivkontrollen). Keines der sechs Präparate, in denen Cathepsin-K nur extrazellulär oder gar nicht zu detektieren war, zeigte TRAP-positive Zellen. (*Tab. 7 und Abb. 14*)

Tab. 7: Ergebnisse der Färbungen für Chondrogenese- und Osteoklastenmarker in Relation zur Verkalkungsintensität

Anfärbung	Präparateanzahl	Verkalkungsgrad	
		gering (vK+)	intensiv (vK++)
SOX-9			
positiv	66	15	51
negativ	14	6	8
intrazellulär	63	14	49
intra- und extrazellulär	3	1	2
Kollagen II			
positiv	79	21	58
negativ	1	1	0
extrazellulär	39	11	28
intra- und extrazellulär	40	10	30
Cathepsin-K			
positiv	79	20	59
negativ	1	1	0
extrazellulär	5	0	5
intra- und extrazellulär	74	20	54
TRAP			
positiv	35	7	28
negativ	45	14	31

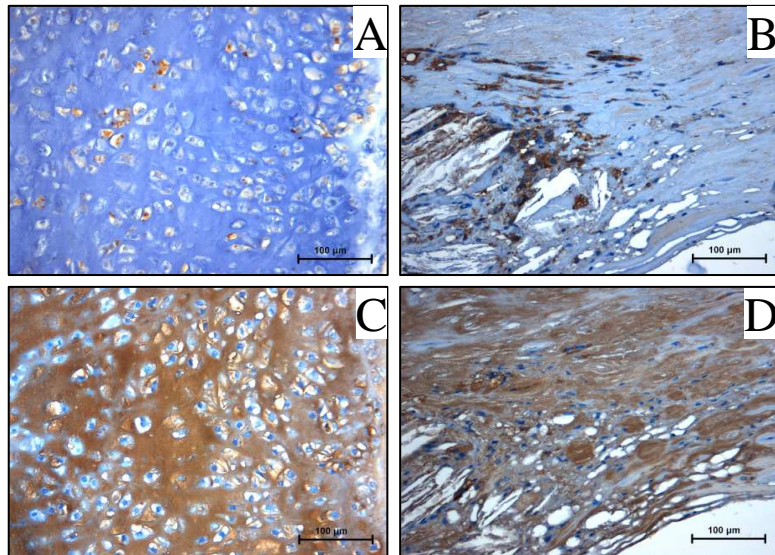


Abb. 13: Nachweis von SOX-9 (A,B) und Kollagen II (C,D) als Chondrogenesemarker.

Für die Positivkontrolle der beiden Marker wurde ein Chondrosarkom verwendet, in dem SOX-9 strikt intrazellulär zu sehen ist, während sich Kollagen II intensiv in der ECM wiederfindet (A,C). In der Schulterregion einer atherosklerotischen Intimaläsion finden sich SOX-9 positive Zellen (B) und weit verteilte Kollagen II-Signale (D). Einige Zellhöfe sind von der Kollagen-Anfärbung regelrecht ausgespart (D). (Vergrößerung: A-D: 200x)

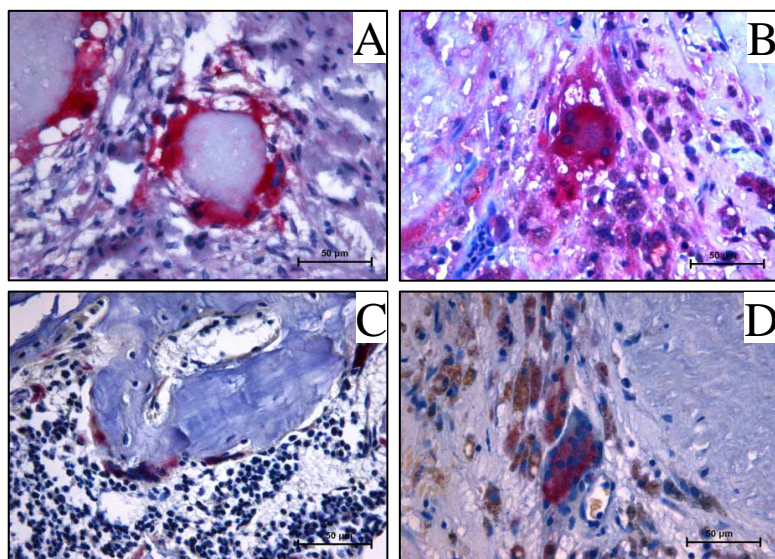


Abb. 14: Nachweis von Cathepsin-K (A,B) und TRAP (C,D) als Osteoklastenmarker.

Als Positivgewebe wurden Schafs- und Rattenknochen verwendet, in denen sich die Osteoklasten als rot angefärbte und teilweise multinukleäre Zellen zeigen, die um Osteoid positioniert sind (A,C). Mehrkernige Zellen mit Cathepsin-K- (B) und TRAP-Anfärbung (D) sind auch in einem multimorphen atherosklerotischen Plaque an gleichem Orte zu finden. Cathepsin-K ist zudem extrazellulär zu sehen (B). (Vergrößerung: E-H: 400x)

4.5.2 Expression von Fetuin-A in Relation zu glatten Gefäßmuskelzellen und Zonen chondrogener Transformation

Im Knochen (Positivgewebe) färbten sich Osteozyten und Lamellen für Fetuin-A an. Auch die Hepatozyten als physiologischer Syntheseort des Fetuin-A zeigten eine deutliche Anfärbung (nicht gezeigt). In allen atherosklerotischen Gefäßwänden konnte Fetuin-A nachgewiesen werden. Ausschließlich extrazelluläre Anfärbungen fanden sich in 26 Präparaten, in den übrigen Präparaten kamen intrazelluläre Fetuin-A-Signale hinzu (Abb. 15). Hierbei war Fetuin-A auch in Gefäßwandanteilen ohne von Kossa-Anfärbung zu sehen.

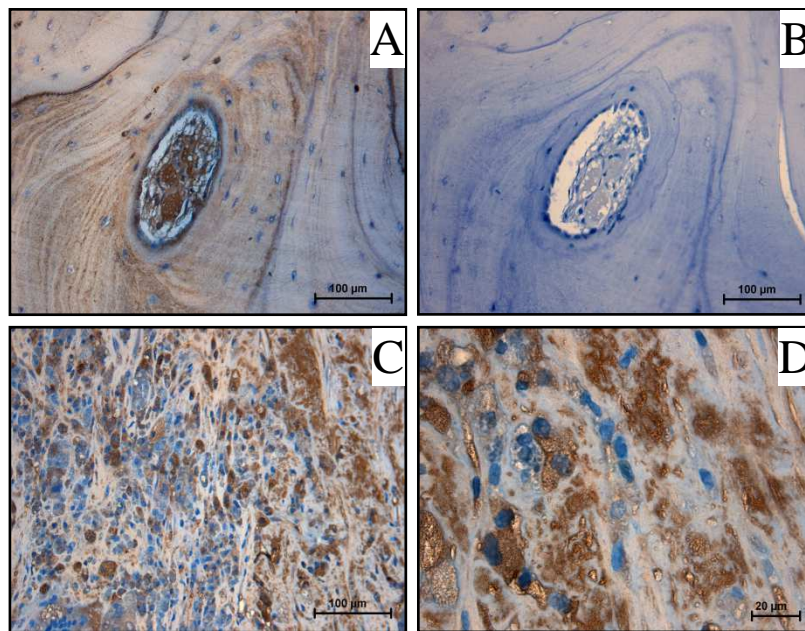


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von Fetuin-A.

In der ossären Positivkontrolle färben sich einige Osteoblasten und Knochenlamellen in Form von Jahresringen an (A). Die Negativkontrolle zeigt keinerlei Anfärbung (B). Im gezeigten atherosklerotischen Ausschnitt finden sich intra- und extrazelluläre Fetuin-A-Signale (C,D). Während die Zelldichte vom linken zum rechten Bildrand abnimmt, verstärkt sich die Ausprägung der extrazellulären Fetuin-A-Signale (C).¹⁰⁵

(Vergrößerung: A,B,C: 200x; D: 630x)

Gemäß der unterschiedlichen Expression von Fetuin-A (intra- und extrazelluläre bzw. ausschließlich extrazelluläre Signale) erfolgte eine Einteilung der Patienten in zwei Gruppen.

Die Serumkonzentration von HDL und Harnstoff zwischen diesen beiden Gruppen unterschied sich signifikant (Abb. 16). Des Weiteren waren Patienten, in deren Präparaten Fetuin-A extra- und intrazellulär nachweisbar war, überwiegend Bluthochdruckpatienten ($p < 0.05$).

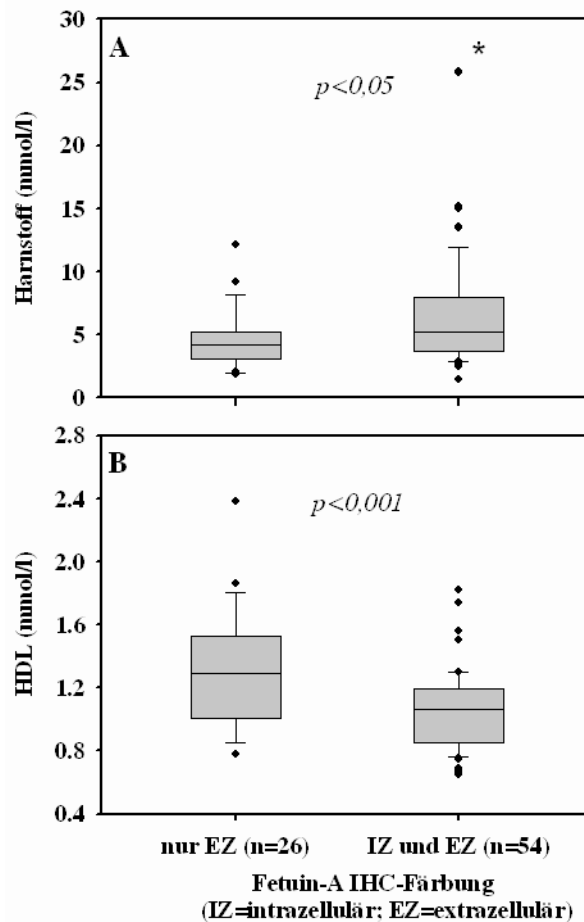


Abb. 16: Die Fetuin-A-Expression in der Immunhistochemie in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration (A) bzw. der HDL-Konzentration (B) im Blut.

Die Färbungen wurden danach klassifiziert, ob Fetuin-A nur extrazellulär oder sowohl extrazellulär als auch intrazellulär nachzuweisen war. Die Beziehung bleibt auch ohne den mit *-markierten Wert signifikant (A).

In der Mehrzahl der Präparate waren Fetuin-A- und SMA-positive Areale räumlich getrennt. Fetuin-A fand sich dabei vor allem in stark umgebauten Wandanteilen, trat jedoch auch in Arealen mit überwiegend SMA-positiver Anfärbung von VSMCs auf. So waren selbst in fast nativen Gefäßwandanteilen ohne Verkalkungen oder Lipidansammlungen Fetuin-A positive Areale zu sehen (Abb. 17 A-C). Die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Kollagen II und Fetuin-A zeigte eine klare Colokalisation der Antigene, bei der die Signale der AP- und der DAB-Färbungen kaum voneinander zu unterscheiden waren. Diese Form fand sich vor allem bei beginnenden atherosklerotischen Läsionen im extrazellulären Raum. Demgegenüber überwog die AP-Färbung (Fetuin-A) in den weiter fortgeschrittenen und zum Teil thrombo-sierten Läsionen. (Abb. 17 D-E)

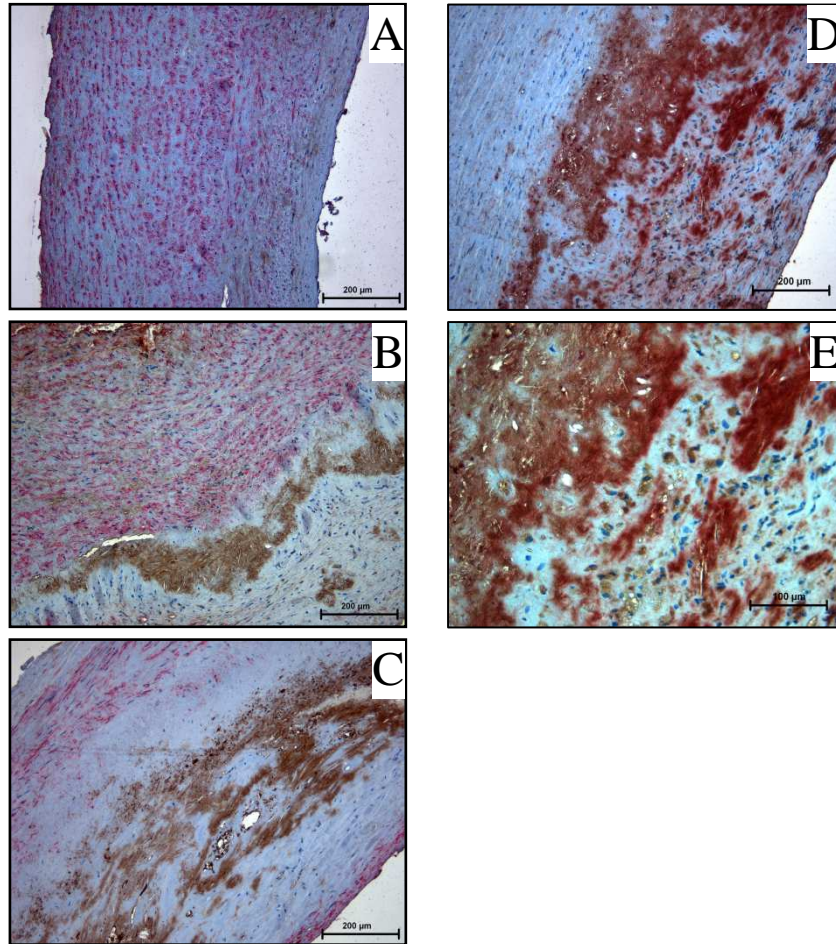


Abb. 17: Immunhistochemische Doppelfärbungen von Fetuin-A und smooth muscle cell actin (SMA) (links) bzw. Fetuin-A und Kollagen Typ II (rechts).

Feine bräunliche Areale (Fetuin-A) sind bereits in regulärer Gefäßwand (rot angefärbte VSMCs) (A) zu sehen. Ein zusätzlich flankierendes Fetuin-A-Signal in SMA freier Intima ist in (B) erkennbar. In der VSMC-armen Region mit beginnenden Wanddefekten überwiegt die Fetuin-A-Anfärbung (C).¹⁰⁵

Kollagen Typ II und Fetuin-A zeigen sich an gleichem Ort und die Färbesubstrate überlagern sich zu einem braunrötlichen Signal (D, E). (Vergrößerung: A-D: 100x, E: 200x)

4.5.3 Expression von FGF-23 in Relation zu glatten Gefäßmuskelzellen und dem FGF-23-Corezeptor Klotho

In 69 von 80 Präparaten ließ sich FGF-23 immunhistochemisch nachweisen. In vier Präparaten fanden sich leichte extrazelluläre Signale, abgesehen davon war FGF-23 ausschließlich intrazellulär präsent. Vor allem in den Schulterregionen der die Gefäßwände auftreibenden Plaques und in stark umgebauten Gefäßwandabschnitten fanden sich Zellen mit positiver Anfärbung. Die Färbesignale imponierten teilweise als vesikuläre Strukturen (Abb. 18).

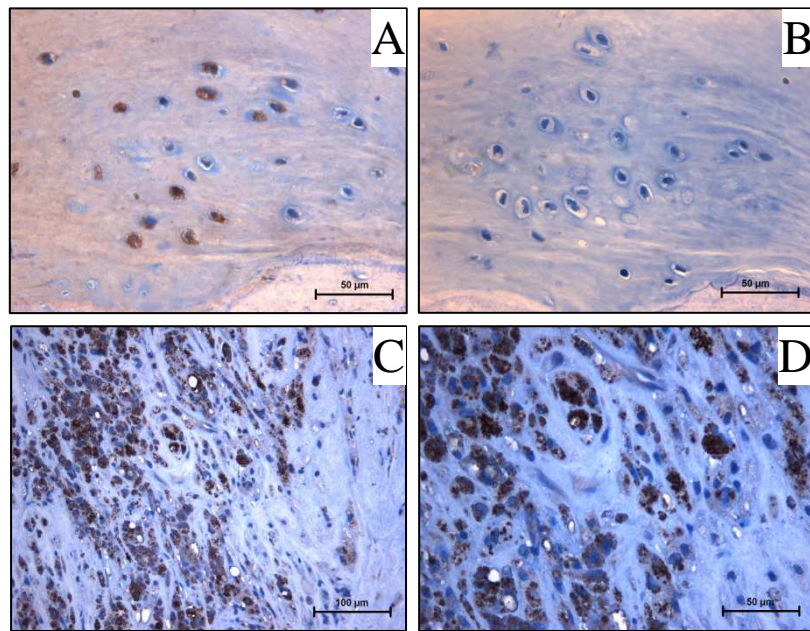


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von FGF-23

Als Positivgewebe wurde humaner Knochen verwendet. Dort sind angefärbte Osteozyten zu sehen (A). Die Negativkontrolle ist unauffällig (B). Im atherosklerotischen Präparat sind FGF-23 positive Zellen zu sehen (C,D). (Vergrößerung: A,B,D: 400x; C: 200x)

Vergleicht man die Laborwerte und Krankengeschichten zwischen Patienten mit IHC-positiven und IHC-negativen Präparaten, so kommt man zu den in Abb. 19 dargestellten, statistisch signifikanten Beziehungen.

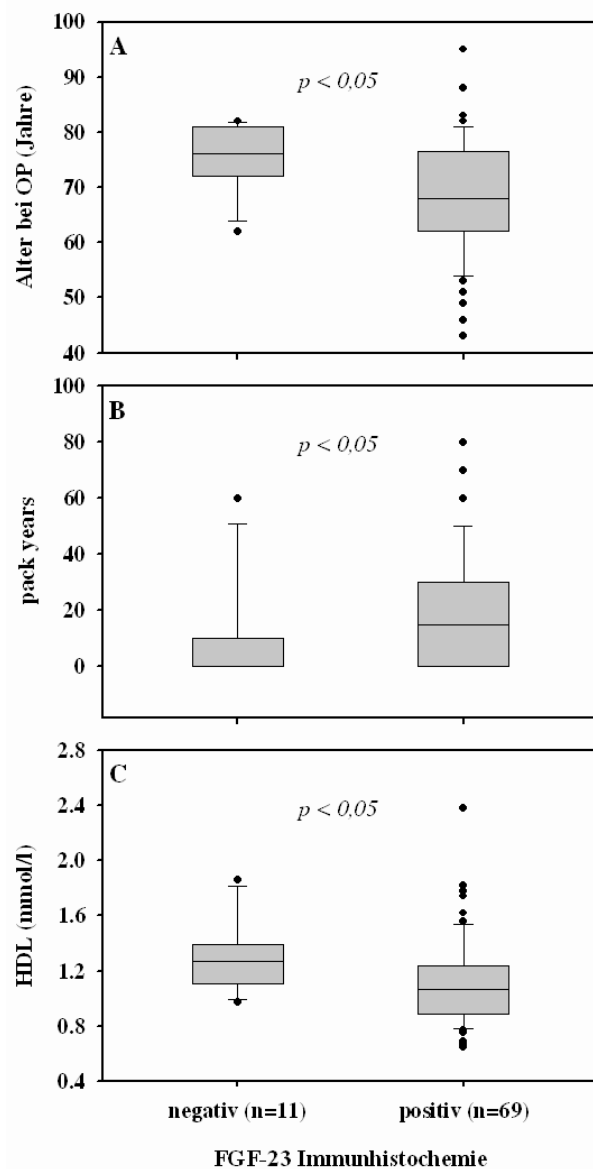


Abb. 19: Die FGF-23 Expression in der Immunhistochemie in Abhängigkeit von dem Patientenalter bei Operation (A), der Zigarettenbelastung (py) (B) und der HDL-Konzentration im Blut (C).

Bei der simultanen Anfärbung von SMA und FGF-23 zeigte sich eine klare räumliche Trennung der VSMCs und der FGF-23 positiven Zellen. Die Zellnester mit intrazellulären FGF-23-Signalen lagen weit ab von SMA-positiven Abschnitten. Färbeüberlagerungen wie bei den immunhistochemischen Doppelfärbungen von Fetuin-A lagen nicht vor (Abb. 20).

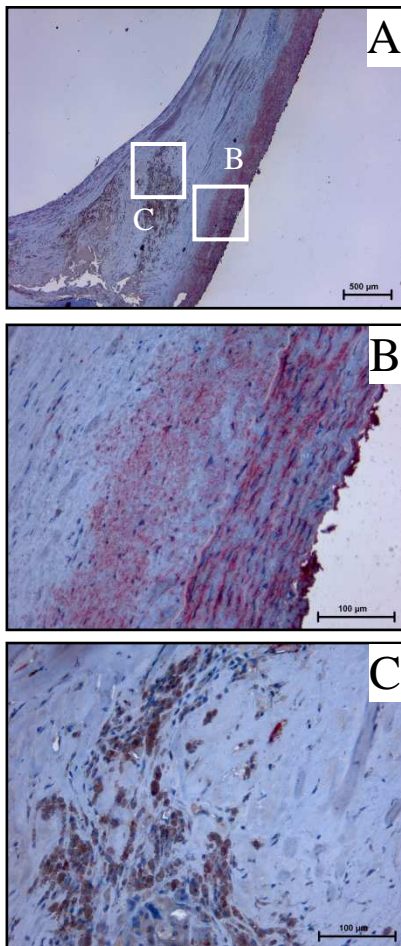


Abb. 20: Immunhistochemische Doppelfärbung von FGF-23 und smooth muscle cell actin (SMA)

Die bereits verbreiterte Intima am oberen Bildrand geht in eine atherosklerotische Läsion über (A). FGF-23 exprimierende Zellen bilden ein Nest in der Schulterregion der Plaque (C) fernab der SMA positiven Zellen (B). ¹⁰⁵ (Vergrößerung: A: 25x; B,C: 200)

In zehn FGF-23 positiven Präparaten wurde die Expression des FGF-23 - FGFR Cofaktors Klotho immunhistochemisch untersucht. Im Nierengewebe, welches als Positivkontrolle für die immunhistochemische Färbung von Klotho verwendet wurde, zeigten sich einzelne Tubuli deutlich positiv (Abb.21). Die detektierten Strukturen verteilten sich fein granulär in den Epithelzellen. Nierenglomeruli wiesen keine positiven Areale auf.

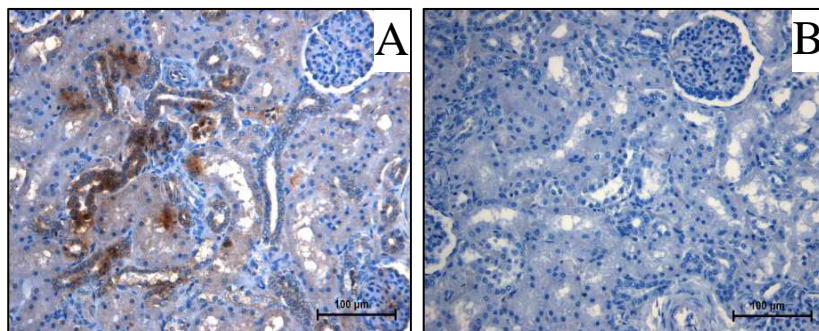


Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis von Klotho in humaner Niere.

Einzelne Tubuli sind angefärbt, während der Glomerulus (rechts oben) ausgespart bleibt (A). Die Negativkontrolle ist unauffällig (B). (Vergrößerung: 200x)

In den Gefäßen färbten sich exakt die Zellen für Klotho an, die auch positiv für FGF-23 waren (Abb. 22). Dies war in allen zehn ausgewählten Präparaten der Fall.

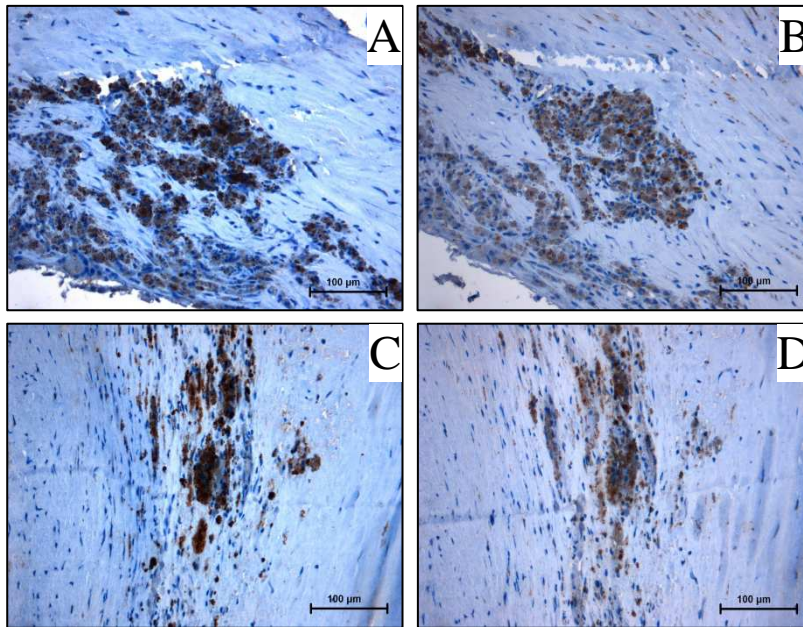


Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis von Klotho und FGF-23.

Jeweils korrespondierende Areale (serielle Schnitte) in atherosklerotischen Läsionen zeigen simultane Färbemuster für Klotho (A,C) und FGF-23 (B,D). (Vergrößerung: 200x)

4.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an gesunder und atherosklerotischer Gefäßwand

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer nativen, gesunden Gefäßwand sind in Abb. 23 dargestellt. Die glatten Gefäßmuskelzellen waren durch dünne interzelluläre ECM-Stränge getrennt. Der Zellverbund war kompakt. Am Übergang von Media zur Adventitia zeigte sich eine intakte Membrana elastica externa. Des weiteren fand sich in einer Zellrichtung vermehrt ECM mit den abgebildeten Strukturen. Dabei könnte es sich um mehrere Matrixvesikel handeln. Eines der Vesikel hat womöglich einen Kristall geladen. Die ovalen bis kreisrunden Aufhellungen in den Bildern sind Artefakte, hervorgerufen durch die Probenfixierung und den Elektronenstrahl.

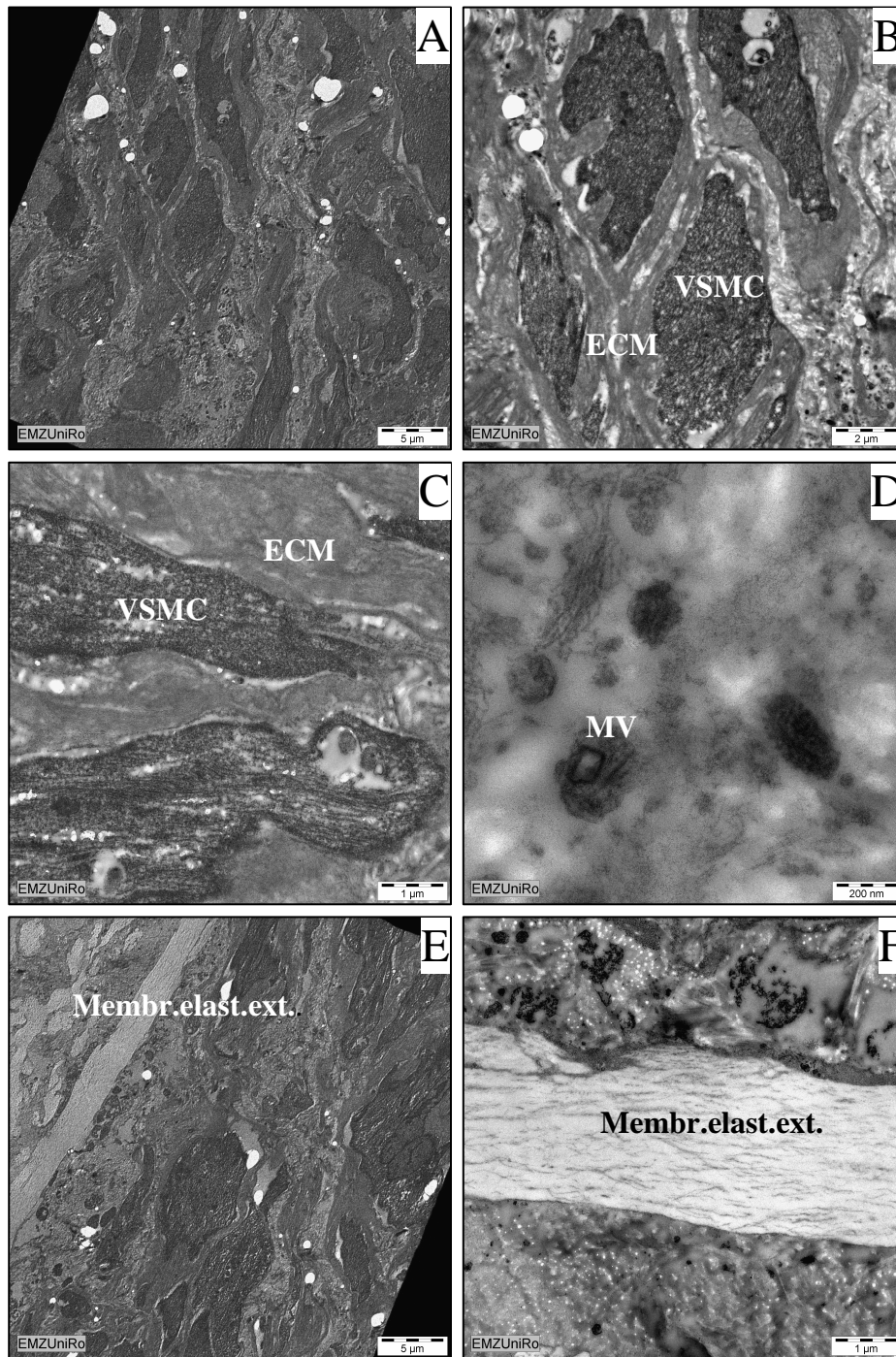


Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer makroskopisch unveränderten Gefäßwand

Es ist eine regelrechte Anordnung der spindelförmigen VSMCs, die durch dünne ECM getrennt sind, zu sehen (A-C). Bei den in (D) fotografierten Strukturen könnte es sich um Matrixvesikel (MV) handeln, darunter eines mit intravesikulärem kristalloiden Körper (Pfeil). Die Membrana elastica externa ist gut erhalten und von der restlichen Gefäßwand zu unterscheiden (E,F). (Vergrößerung: A: 800x; B: 1.985x; C,F: 4.000x; D: 20.000x; E: 400)

4.7 Immunogoldfärbungen von Fetuin-A, smooth muscle cell actin (SMA) und FGF-23 an einem atherosklerotischen Gefäßpräparat

Bei den Aufnahmen eines atherosklerotisch veränderten Gefäßwandanteiles zeigte sich, dass in dem ausgewählten Abschnitt des OP-Präparates die Morphologie durch ECM bestimmt und Zellen nur sehr schwer zu finden waren.

Bei der Fetuin-A-Färbung fanden sich Ansammlungen von Goldpartikeln im Präparat. Diese waren an fibrillenartigen Strukturen zu erkennen. Intrazelluläre Goldpartikel waren nicht zu finden. In hellen Präparatearealen ohne strukturgebende Fibrillen konnten kaum Goldpartikel gesehen werden (*Abb. 24*). Die Bilder zeigten sich in Übereinstimmung mit den Kollagen II - Fetuin-A-Doppelfärbungen (Kap. 4.5.2).

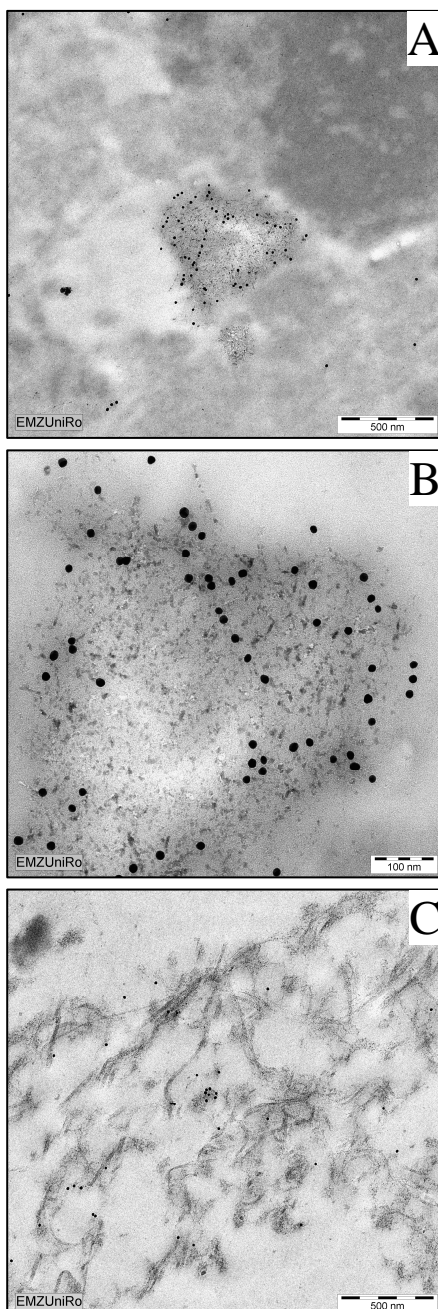


Abb.24: Immunogoldfärbung für Fetuin-A

Die Goldpartikel zeigen sich an fibrillären Strukturen. Eine eindeutige zelluläre Zuordnung ist nicht möglich (A,B,C).

(Vergrößerung: A,C,: 12.500x; B: 40.000x)

Vor der Immunogoldfärbung von SMA war es schwierig, in dem kleinen Gewebestück erhaltene Zellen zu finden, um es mit den Verhältnissen im nativen Gefäß vergleichen zu können (Kap. 4.6). Nach Färbung und Kontrastierung des Grids konnte man jedoch selektive Ansammlungen der Partikel erkennen und somit zelluläre Strukturen besser identifizieren. Die Immunogoldpartikel sammelten sich unter Aussparung der Zellkerne im Zytoplasma an (Abb. 25A, B).

Die Immunogoldfärbung von FGF-23 zeigte kein eindeutiges Bild. Die Aufnahmen repräsentieren eine zur Fetuin-A-Färbung ähnliche Ansammlung von Goldpartikeln. So lagerten sich die mit Goldpartikeln beladenen Antikörper tendenziell auch an Fibrillen an. Allerdings waren auch im restlichen Gewebe zahlreiche Goldpartikel zu sehen. Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie für FGF-23 ergeben kein klares Bild. Eine Aussage über die elektronenmikroskopische Verteilung von FGF-23 ist deshalb kaum möglich. Das Fehlen von dedifferenzierten VSMCs in dem generell sehr zellarmen Abschnitt könnte ein Grund dafür sein (Abb. 25C, D).

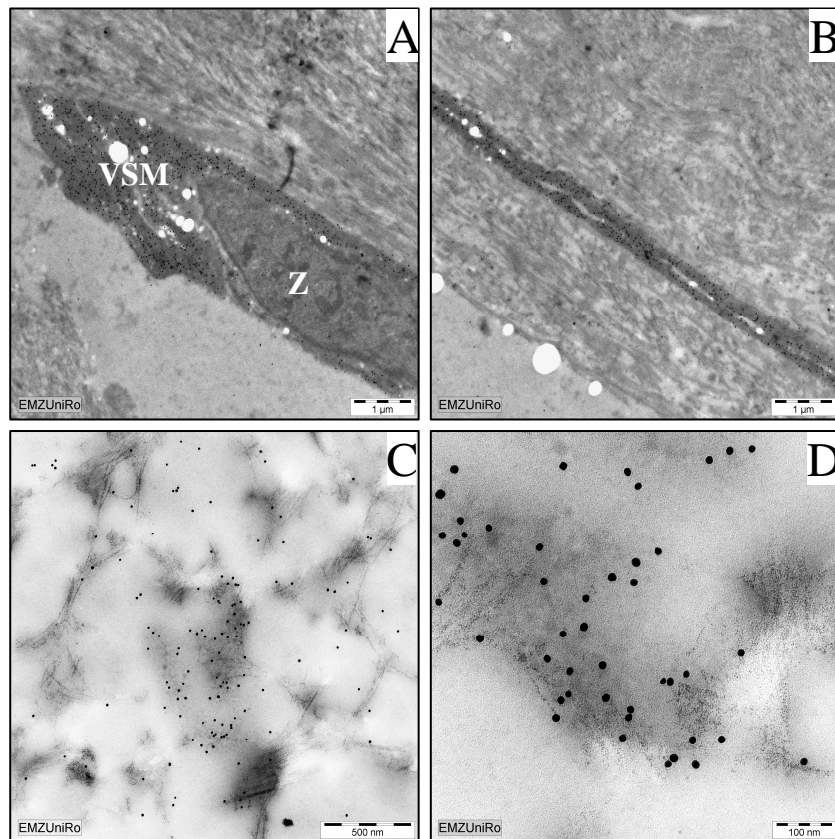


Abb. 25: Immunogoldfärbung von smooth muscle cell actin (SMA) und FGF-23.

SMA-Färbung: Die Zelle (A) und der schmale, wahrscheinlich zelluläre Ausläufer (B) sind mit Goldpartikeln besetzt. (ZK-Zellkern; Vergrößerung: 4.000x); FGF-23 Färbung: Die hier abgebildeten Goldpartikel lagern sich tendenziell an kollagenartigen Strukturen ab (A,B). Generell ist die Färbung aber relativ unspezifisch, intrazelluläre Partikelansammlungen sind nicht eindeutig zu finden. (Vergrößerung: C: 12.500x; D: 40.000x)

5 Diskussion

Im Rahmen der Arbeit wurden in korrespondierenden Proben von Patienten mit Atherosklerose die systemische Konzentration von Fetuin-A und FGF-23 sowie die lokale Verteilung der beiden Proteine untersucht. Parallel dazu wurden atherosklerotische Risikofaktoren aus der Krankengeschichte erfasst.

Die Serumkonzentration von Fetuin-A ist positiv mit der Albumin- sowie Phosphatkonzentration, dem Gewicht (bzw. dem BMI), dem Hämatokritwert und dem Calcium-Phosphat-Produkt sowie der präoperativen CrP-Konzentration assoziiert. Demgegenüber besteht eine negative Assoziation zwischen der Fetuin-A- und der alkalischen Phosphatase- sowie der cFGF-23-Serumkonzentration.

Die Serumkonzentration von cFGF-23 korreliert lediglich mit der Raucheranamnese und der zeitlichen Nikotinbelastung signifikant positiv.

In den Gefäßproben konnten neben bindegewebig umgebauten und verkalkten Arealen und Markern des knöchernen Umbaus auch Fetuin-A sowie FGF-23 und dessen Co-Rezeptor Klotho nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen und ergänzen diese Ergebnisse.

5.1 Risikofaktoren der Atherosklerose

Die überwiegende Mehrzahl der Studienpatienten wiesen die für die Entwicklung einer Atherosklerose bekannten Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Dyslipidämie und Nikotinabusus auf.

Einer der wichtigsten bekannten Risikofaktoren für atherosklerotisch bedingte Schlaganfälle ist die arterielle Hypertonie. Bei 70 unserer 80 Patienten konnte anamnestisch eine hypertone Belastung erhoben werden. Hierbei fiel vor allem auf, dass viele Patienten über die tatsächliche Dauer und Schwere der Erkrankung sowie die verordnete antihypertensive Medikation nicht ausreichend informiert waren. Dieser primär subjektive Eindruck wird in der Literatur bestätigt. So wissen nur 70% der Amerikaner mit arteriellem Bluthochdruck von ihrer Erkrankung, lediglich 60% der bekannten Hypertoniker werden behandelt und nur 34% auch tatsächlich adäquat kontrolliert¹⁰⁷. Dabei ist speziell bei Patienten, die unter einem Diabetes mellitus und/oder einer chronischen Niereninsuffizienz leiden und damit ein erhebliches Risiko für Gefäßverkalkungen aufweisen, eine restriktive Blutdruckeinstellung (130/80 mmHg oder niedriger), insbesondere bei zusätzlicher Proteinurie, für die Protektion des kardiovaskulären Systems essentiell^{108, 109}.

Ebenso eindeutige Verbindungen gibt es zwischen dem Auftreten von Fettstoffwechselstörungen und dem Risiko eines ischämischen Schlaganfalls. So nimmt durch einen Anstieg der Gesamtcholesterol-Konzentration um 1 mmol/l das Schlaganfallrisiko zwi-

schen 6% und 25% zu ¹¹⁰. Umgekehrt sinkt dieses Risiko bei einer HDL-Konzentrationszunahme von 1 mmol/l um 47% ¹¹¹. Die geringe mediane HDL-Konzentration unserer Patienten (Männer: M = 1,05mmol/l; Frauen: M = 1,19 mmol/l) ist insofern ein Hinweis auf die erhöhte atherosklerotische Risikokonstellation, obwohl die medianen LDL- und Triglyceridkonzentrationen nur unwesentlich erhöht sind und der mediane LDL/HDL-Quotient unserer Studienteilnehmer im empfohlenen Bereich liegt. Die Umstellung ihrer Ernährungsgewohnheiten bei einer gewissen Zahl der zum Teil langjährigen Gefäßpatienten und die Medikation mit potenten LDL-senkenden Statinen bei 70% unserer Studienteilnehmer sind denkbare Ursachen dieser Ergebnisse.

Ob und in welcher Form erhöhte Konzentrationen von Lipoprotein(a), wie sie bei 30 unserer Patienten gemessen wurden, zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen und Thromben beitragen, ist noch nicht vollständig geklärt ¹¹². Zumindest im Rahmen der koronaren Herzerkrankung ist ein solcher Zusammenhang beschrieben ¹¹³. In unserer Patientengruppe ergaben sich weder Beziehungen zwischen der Lp(a)-Konzentration und der KHK- bzw. pAVK-Prävalenz, noch fanden sich Unterschiede zwischen Patienten mit symptomatischer oder asymptomatischer Stenose der A. carotis (Daten nicht gezeigt).

Auch der atherogene Einfluss des Rauchens ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ^{114, 115}. Das Risiko einer zerebralen Ischämie steigt mit Dauer und Intensität des Nikotinabusus an. So verursacht das Rauchen ca. 12-15% aller letalen Schlaganfälle ^{116, 117}. Bei uns waren zum Zeitpunkt der Carotisoperation mit 13,3% der weiblichen und 40% der männlichen Studienteilnehmer deutlich mehr aktive Raucher zu finden, als es der Vergleich mit der durchschnittlichen Raucherprävalenz für diese Altersklasse (Frauen: 7%, Männer: 15% ¹¹⁸) annehmen ließ. Der Risikofaktor Nikotinabusus hat auch deshalb einen so wichtigen Stellenwert, da er schlicht vermeidbar ist. Wenngleich sich jedoch das Schlaganfallrisiko bei Aufgabe des Rauchens erheblich verringert, kann der Ausgangswert eines Menschen ohne aktive oder passive Belastung nicht wieder erreicht werden ¹¹⁰.

5.2 Histomorphologische Charakterisierung der Gefäße

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand die histomorphologische/immunhistochemische Charakterisierung der Gefäßveränderungen in Relation zu den verkalkten Arealen. Die morphologischen Veränderungen reichten von moderaten Intimaverdickungen bis hin zu thrombosierte Läsionen. Bei 5 Präparaten fanden sich lediglich diskrete Umbauvorgänge der Arterienwand in Verbindung mit geringen Verkalkungen (vK1 oder vK2). Hier könnte es sich um atherosklerotische Ulcera der Gefäßwand handeln, bei denen die Gefahr der Thrombusbildung offenbar noch höher ist als bei stenosierenden Gefäßplaques ¹¹⁹. Eine andere Ursache für die nur diskret ausgeprägten Befunde könnte sein, dass das zur Paraffin-

einbettung entnommene Gewebe zu weit im Gesunden und vor der eigentlichen Läsion herausgeschnitten wurde.

Bei den von uns als vK1 klassifizierten Kalzifizierungen könnte es sich um Verkalkungen von Elastinfasern handeln (Typ II nach Bobryshev et al 2005), bei denen strukturelle Veränderungen der Elastinfasern (z.B. Vakuolisierung) der Kalzifizierung vorausgehen. Diese Typ-II Kalzifizierungen imponieren u.a. in den Schulterregionen der Plaques. Typ I Verkalkungen hingegen, die in tiefen nekrotischen Anteilen der Plaques auftreten, zeigen im Vorfeld der Verkalkung keine sichtbaren Veränderungen der Elastinfasern¹²⁰.

Die überwiegende Zahl der Präparate zeigte jedoch Charakteristika weit fortgeschrittener, komplizierter Läsionen. In Analogie zu der American Heart Association (AHA)-Klassifikation für die Einteilung atherosklerotischer Herzkranzgefäße gehören die meisten unserer Präparate den Typ Vb Läsion bzw. den fibrokalzifizierten Plaques an. Die für eine Klassifizierung als „vK3“ und „vK4“ von uns geforderten destruktiven Kalkschollen könnten mit den dort genannten „calcified nodules“ verglichen werden^{121, 122}.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass symptomatische im Vergleich zu asymptomatischen Stenosen weniger verkalkte Anteile und vermehrt inflammatorische Makrophagen aufweisen. So liegt die Vermutung nahe, dass sich Kalzifizierungen stabilisierend auswirken¹²³. Vergleichbare Beziehungen zwischen symptomatischen bzw. asymptomatischen Stenosen und ihrem Verkalkungsgrad (von Kossa Score) waren in unserem Patientenkollektiv nicht zu finden (Daten nicht gezeigt).

5.3 Marker der Osteo- und Chondrogenese

Es ist immer noch eine offene Frage, ob und in welchem Maße Gefäßverkalkungen Folge oder Ursache enchondraler (De)-Differenzierungen sind. Die Expression von Matrixproteinen und Kollagenen des Knochens und des Knorpels in atherosklerotischen Läsionen wurde in vielen Arbeiten beschrieben. So konnten beispielsweise Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, Kollagen I, alkalische Phosphatase, bone sialoprotein, Matrix-Gla-Protein und bone morphogenetic protein (BMP) -2 und -4 in Arterienwänden nachgewiesen werden¹²⁴⁻¹²⁹. Hunt et al 2002 berichten sogar von lamellären Knochenformationen innerhalb intensiv verkalkter Läsionen bei eher asymptomatischen Plaques der A. carotis¹³⁰.

Auch in unseren Präparaten waren Marker für dedifferenzierte Zellen nachweisbar. Allerdings fehlten z.B. SOX-9 positive Zellen in 14 nur leicht verkalkten bzw. insgesamt sehr zellarmen Präparaten. Obwohl SOX-9 ein notwendiger Transkriptionsfaktor für das knorpel-spezifische Kollagen Typ II ist, war Kollagen II in SOX-9 negativen Präparaten vorhanden. Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Einige dieser Präparate waren durch ECM dominiert und sehr zellarm. Die Aussicht darauf, in diesen Präparaten SOX-9 positive Zellen anzutreffen, war demnach gering. Andererseits waren die Veränderungen in diesem Gefäßab-

schnitt möglicherweise schon so weit fortgeschritten, dass chondrogene durch osteogene Faktoren ersetzt worden waren.

Für den Nachweis von Osteoklasten bzw. Osteoklasten-artigen Zellen ergänzten wir die Anfärbung von Cathepsin-K mit der Färbung von TRAP, einem weiteren Schlüsselenzym der Osteoklasten. Die Färbesignale von Cathepsin-K waren in umgebauten Gefäßabschnitten sowohl intra- als auch extrazellulär zu finden. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass Cathepsin-K auch beim Auftreten von Scherkräften in atherosklerotischem Gefäßendothel freigesetzt wird und sich generell am Abbau von ECM sowie an lysosomaler Hetero- und Autophagie beteiligt ¹³¹. So konnte der Nachweis von Cathepsin-K nur Hinweise auf mögliche Osteoklasten-artige Zellen geben. Die Ergebnisse beider Färbungen stimmen aber insofern überein, als dass die sechs Präparate ohne intrazelluläre Cathepsin-K-Signale auch keine TRAP-Signale aufwiesen.

Die vielfach beschriebene Theorie einer enchondralen Ossifikation in den Gefäßen wird durch unsere Ergebnisse unterstützt, da sowohl SOX-9 als Marker der Chondrogenese und Kollagen Typ II als typisches Kollagen des Gelenkknorpels als auch Cathepsin-K und TRAP als Marker für „reife“ Osteoklasten nachweisbar waren ¹³²⁻¹³⁵. Unter diesem Aspekt lassen sich die potentiellen Funktionen von Fetuin-A und FGF-23 in der Zirkulation und in den Plaques verstehen.

5.4 Fetuin-A

Fetuin-A hat sich in den letzten Jahren als wichtiger Mediator in der Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts, des Knochenstoffwechsels und der Gefäßverkalkung herauskristallisiert ⁴³. Schwerpunkt bisheriger Untersuchungen waren vor allem die systemischen Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus ^{57, 136-138}.

Bei unseren Patienten folgten die Fetuin-A-Serumkonzentrationen einer statistischen Normalverteilung. Mit einem Median von 0,389 g/l rangierten sie leicht unterhalb des in der Literatur für diese Methode angegebenen Wertebereichs von 0,40 - 1,00 g/l ³⁹. Da Fetuin-A als Reaktant der akuten Phase bekannt ist und negativ mit der CrP-Konzentration korreliert, relativieren sich die postoperativ bestimmten und daher vergleichsweise niedrig erscheinenden Werte entsprechend. Die Konzentrationen lagen innerhalb des von unserer Arbeitsgruppe bestimmten pädiatrischen Referenzbereiches ($0,460 \pm 0,240$ g/l) ¹³⁹.

Einige der von uns gefundenen Assoziationen zwischen der Fetuin-A-Serumkonzentration und klinischen Parametern wie dem Patientengewicht (bzw. dem BMI) bestätigen die Angaben in der Literatur ^{64, 140}. Schon bei übergewichtigen Kindern mit einer Steatosis hepatis finden sich erhöhte Konzentrationen von Fetuin-A. Daneben zeigten sich signifikante positive Korrelationen mit der Insulinresistenz, dem Hüftumfang, dem Blutdruck und dem HDL-

Cholesterol ¹⁴¹. Diese Veränderungen sind alle unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zu vereinen. Hennige et al 2008 zeigten, dass Fetuin-A die Produktion von Adiponec-tin, einem Insulin-sensibilisierenden und atheroprotektiven Faktor, inhibiert. Dies könnte eine wichtige Verbindung zwischen erhöhten Fetuin-A-Konzentrationen und dem metabolischen Syndrom sowie einem damit verbundenen erhöhten kardiovaskulären Risiko darstellen ¹⁴².

Auch die positive Korrelation zwischen Fetuin-A und Albumin bestätigt frühere Arbeiten ^{51, 136, 143}. Beide Proteine binden Calcium durch ihre negativen Ladungen und eine höhere Konzentration des ionisierten (freien) Calciums könnte Ausdruck einer reduzierten Konzentration bzw. Verfügbarkeit der Trägerproteine sein ¹⁴³. Die positive Korrelation zwischen der Fetuin-A-Konzentration und dem Hämatokritwert könnte als unspezifischer Ausdruck eines guten Allgemeinzustandes angesehen werden. Die negative Korrelation mit der alkalischen Phosphatase könnte eventuell durch ossäre Veränderungen mit einem vermehrten Aufkommen des Enzyms im Blut bei erniedrigten Fetuin-A-Konzentrationen hervorgerufen werden. Interessant sind die von uns gemessenen Fetuin-A-Konzentrationen v.a. im Hinblick auf die Grunderkrankungen der Patienten. Bei Patienten mit geringfügig eingeschränkter Nierenfunktion (n=19) fanden sich in Übereinstimmung mit einer früheren Studie noch normale Werte ⁵⁷. Patienten mit einem Diabetes mellitus zeigten tendenziell höhere Fetuin-A Werte (keine Signifikanz). Diesbezügliche Berichte in der Literatur sind eher widersprüchlich ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Eine Verbindung zwischen den Fetuin-A-Konzentrationen und dem Gefäßstatus bei unseren Patienten herzustellen, ist schwierig. Es gibt Untersuchungen, die positive Assoziationen zwischen der Fetuin-A-Serumkonzentration und der Steifigkeit ¹⁴⁷ bzw. der Intima-Media-Dicke von Arterien zeigen ¹⁴⁸. Andererseits kann Fetuin-A möglicherweise auch in-vivo TNF- α inhibieren. TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und könnte die Dedifferenzierung von VSMCs zu Osteoblasten fördern ¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Mit der Inhibition von TNF- α verringert sich gleichsam auch das Risiko für bzw. das Ausmaß der Endotheldysfunktion und aller nachfolgenden Umbauprozesse. Die tendenziell niedrigen Fetuin-A-Konzentrationen unserer Patienten weisen in diesem Szenario auf eine unzureichende Inhibition von TNF- α hin, unter anderem auch deshalb, weil stark veränderte Gefäße Indikation zur Operation waren.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass zirkulierendes Fetuin-A vor ektopen Verkalkungen der Weichteile und somit auch der Gefäße schützt, indem es zur Formation und Stabilisierung der CPP in der Zirkulation beiträgt. Hierbei stabilisiert Fetuin-A die Calcium-Phosphat-Partikel erst ab einer bestimmten Größe und verhindert so die weitere Präzipitation von Mikrokristallen überall dort, wo keine Mineralisation stattfinden soll ^{41, 44}. Setzt man niedrige Fetuin-A-Konzentrationen mit einer verringerten Pufferkapazität gleich, wären demnach vermehrt Calcium-Phosphat-Kristalle im Umlauf, die ohne „Aufpasser“ aggregieren könnten ⁴⁵.

Bei der Auswertung der Immunhistochemie für Fetuin-A zeigten sich in jedem Präparat positive intra- und/oder extrazelluläre Signale. In den seriellen Präparateschnitten könnte die im Vergleich zur histologischen Methode höhere Sensitivität der Immunhistochemie für das Auftreten positiver Fetuin-A-Färbesignale an Lokalisationen, die sich in der von Kossa-Färbung nicht als verkalkt dargestellt hatten, verantwortlich sein. Präparate, in denen sowohl extra- als auch intrazelluläre Anfärbungen von Fetuin-A zu sehen waren, stellen weiter fortgeschrittene Läsionen dar als Präparate mit singulärer Anfärbung der ECM. Fetuin-A positive Zellen waren weitestgehend negativ für SMA, dem Marker für native, glatte Gefäßmuskulzellen.

Passend dazu fanden sich Assoziationen zwischen dem Auftreten kombinierter extra- und intrazellulärer Fetuin-A-Anfärbung und den niedrigen HDL-Konzentrationen sowie der erhöhten Hypertonieprävalenz in dieser Gruppe. Niedrige HDL-Werte und Hypertonie als Ausdruck eines erhöhten kardiovaskulären Risikos sind demnach möglicherweise mit der fortgeschrittenen Expression von Fetuin-A verbunden. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten lokaler Fetuin-A-Signale und höheren Harnstoffkonzentrationen könnte ähnlich diskutiert werden. Die Korrelation ist allerdings sehr schwach ausgeprägt. Des Weiteren war keine signifikante Assoziation zwischen der Lokalisation der Fetuin-A-Färbungen und einer eingeschränkten Nierenfunktion oder den Kreatininwerten zu verzeichnen.

Die licht- und elektronenmikroskopisch gezeigte Kongruenz von Fetuin-A und Kollagen II passt zur der Theorie der „mineralization by inhibitor exclusion“⁴⁷. Fetuin-A fungiert als „Türsteher“ vor den Kollagenfibrillen, um einen geordneten Aufbau des Proteingerüsts zu gewährleisten, in das dann von Fetuin-A freigesetzte Apatitkristalle in passender Größe eindringen können^{47, 152, 153}. Diese Mechanismen wurden größtenteils aufgrund von in-vitro-Untersuchungen an entkalkten Knochen und synthetischen Kollagen I-Netzwerken hergeleitet. Analoge Mechanismen in sich über Jahre entwickelnden atherosklerotischen Plaques mit ossären Strukturen sind durchaus wahrscheinlich. In diesem Szenario würde Fetuin-A zum Ausbau der Verkalkungen beitragen. Dedifferenzierte Gefäßwandzellen nehmen Fetuin-A und/oder an Fetuin-A gekoppelte Hydroxyapatitkristalle auf oder beginnen gar mit einer zell-eigenen Synthese von Fetuin-A. Diese könnte einen Schutzmechanismus darstellen, etwa, um die Phagozytose von CPP zu erleichtern.

Mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Verteilung von Fetuin-A in der Gefäßwand finden sich bei Reynolds et al 2005. Da Fetuin-A die Mineralisation von VSMCs und Matrixvesikeln konzentrationsabhängig hemmt, wurden Fetuin-A anti-atherogene Eigenschaften zugesprochen. Hierbei sind, so die Autoren, drei Vorgänge hauptverantwortlich: 1.) „Death signalling pathways“ werden inhibiert, um die Apoptoserate der VSMCs zu verringern. 2.) In intrazellulären MVs wird die Calcium-Phosphat Komplexbildung verhindert und 3.) Die Phagozytose von Apoptosekörperchen wird gesteigert¹⁵⁴.

In verkalkten Arterien von CNI-Patienten fanden Moe et al 2005 u.a. auch Fetuin-A positive Areale, die ähnlich wie oben dargelegt interpretiert wurden: Zum einen könnte Fetuin-A Calciumphosphat im Serum binden und sich als CPP in den Gefäßen ablagern, wo sie von VSMCs aufgenommen werden. Zum anderen könnten die Ablagerung von CPP und der damit verbundene lokale Schaden durch ein unzureichendes retikuloendotheliales System bedingt sein. Des Weiteren könnten auch durch pathologische Knochenumbauten vermehrt CPP freigesetzt werden, die sich dann in den Gefäßen wiederfinden. Als letzte Möglichkeit postulieren die Autoren, dass bereits in der Gefäßwand befindliches Mineral durch Fetuin-A aufgespürt und als CPP „verpackt“ wird, um so die Phagozytose zu erleichtern⁴⁵. Ebenso denkbar ist jedoch, dass freies Fetuin-A oder CPP nach Endothelschäden, Entzündung und Umbau, wie andere Serumproteine auch, in die Atherome dringt und sich dort an Kollagenfibrillen anlagert. Dort würde es Material für pathologische Verkalkungen liefern. Festzuhalten ist, dass Fetuin-A v.a. bei der Initiierung von Verkalkungen eine wichtige Funktion einnehmen dürfte.

Insgesamt betrachtet ergibt sich ein zweiseitiges Bild in der Bewertung der Fetuin-A-Serumkonzentration. Hohe Werte könnten eine zelluläre Insulinresistenz induzieren, welche den Organismus vermehrt in Richtung Endotheldysfunktion und metabolisches Syndrom steuern lässt. Andererseits hemmt Fetuin-A TNF- α und andere für den Matrixumbau relevante Wachstumsfaktoren. Zu niedrige Konzentrationen hingegen können dazu führen, dass Kontrollmechanismen der Kalzifizierung nicht mehr ausreichend zur Verfügung stehen und Calciumphosphatkristalle in der Gefäßwand vermehrt morphologische Veränderungen hervorrufen.

Bis ausreichende Evidenz für den Einsatz von Fetuin-A als Biomarker des kardiovaskulären Risikos erreicht ist, bedarf es sicherlich noch mehrerer Studien, die etwaige Folgen erhöhter oder erniedrigter Fetuin-A Spiegel beleuchten.

Weiterhin ist zu beachten, dass Fetuin-A nur ein Faktor von vielen ist. Andere potente Verkalkungsinhibitoren, wie z.B. Matrix-Gla-Protein und Pyrophosphat sowie Aktivatoren der Verkalkung, wie Osteoprotegerin, receptor activator nuclear factor κ B oder der monocytes colony stimulating factor sind an den Gefäßveränderungen ebenso beteiligt^{58, 155-158}.

5.5 FGF-23

Für die quantitative Bestimmung von FGF-23 im Blut standen zwei ELISAs zur Auswahl. Während einer dieser Assays nur das intakte Protein (iFGF-23) erkennt, werden mit dem anderen das C-terminale Fragment (cFGF-23) und das intakte Protein erfasst. Da die Resultate beider Bestimmungen recht gut korrelieren, der cFGF-23-Assay jedoch stabiler ist und besser reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurde dieser verwendet¹⁵⁹.

In 30 unserer Proben war die cFGF-23-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Die mediane Konzentration in der Patientengruppe mit messbaren Werten ist vergleichbar mit Ergebnissen nierengesunder Patienten aus anderen Studien¹⁶⁰⁻¹⁶². Erwartungsgemäß liegt sie weit unterhalb der Konzentrationen, die bei CNI-Patienten auftreten können¹⁶³. Bei diesen Patienten kommt FGF-23 wahrscheinlich die entscheidende Rolle als Phosphatonin zu, da es a) die renale Phosphatreabsorption durch die Typ II Natrium-Phosphat-Cotransporter (NaPi2) hemmt, b) die renale Expression der 1 α -Hydroxylase hemmt und dadurch die Produktion von aktivem 1,25-dihydroxy-Vitamin D₃ vermindert und c) die PTH-Produktion inhibiert und dadurch die Osteoklasten-vermittelte Freisetzung von Phosphat aus dem Knochen supprimiert⁵⁴. Bis jetzt wurde die systemische Konzentration von FGF-23 v.a. bei Patienten mit Niereninsuffizienz mit oder ohne Diabetes mellitus und angeborener oder erworbener Hypophosphatämie bestimmt und diskutiert^{88, 159, 164-166}. Bei niereninsuffizienten Patienten korreliert FGF-23 positiv mit Calcium und Phosphat. Dabei kommt es bereits vor Entwicklung einer Hyperphosphatämie zu einem Anstieg der FGF-23 Konzentration. Insofern könnte ein erhöhtes FGF-23 bereits auf einen gestörten Phosphatstoffwechsel hinweisen. Abhängig vom Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung sind Konzentrationsanstiege von FGF-23 im Blut ab einer GFR \leq 60 ml/min⁸⁶ oder 30-80 ml/min¹⁶⁷ bzw. bei Stadium IV einer chronischen Nierenerkrankung¹⁶⁸ dokumentiert.

In unserem Patientenkollektiv wurde lediglich zwischen der Raucheranamnese und der cFGF-23-Serumkonzentration eine signifikante Assoziation beobachtet. Eine durch den Einfluss des Rauchens direkt oder indirekt gesteigerte Produktion und/oder Freisetzung von FGF-23 könnte die Grundlage dessen sein. Es liegen hierzu bislang keine Studien vor.

Eine sehr aktuelle Arbeit zeigt eine diskrete positive Korrelation zwischen der cFGF-23-Konzentration und der Prävalenz linksventrikulärer Hypertrophie bzw. dem linksventrikulären Masseindex bei Patienten mit CNI¹⁶⁹.

Die von uns beschriebene diskrete Verbindung von Fetuin-A und FGF-23 wurde in einer anderen Studie, die der Frage nach Assoziationen beider Proteinkonzentrationen und deren Einfluss auf koronare Verkalkungen nachging, nicht wiedergefunden¹⁷⁰. Auch wenn die hier vorliegende und andere Studien zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Bedeutung von FGF-23 als kardiovaskulärem Risikofaktor kommen, so scheint doch die Beteiligung von FGF-23 an Verkalkungsprozessen unstrittig. Bei FGF^(-/-) Mäusen kommt es zu Verkalkungen in Gefäßen und inneren Organen und bei Patienten mit tumoröser Kalzinose ist der mutationsbedingte Verlust der FGF-23-Aktivität ursächlich. Diese Befunde deuten darauf hin, dass FGF-23 ebenfalls zur Klasse der Verkalkungsinhibitoren gezählt werden sollte. In diesem Sinne lassen sich die hohen Konzentrationen bei CNI-Patienten als reaktiver Schutzmechanismus interpretieren¹⁷¹. Eine unabhängige negative Assoziation zwischen der FGF-23-Konzentration und dem Bestehen einer Mediasklerose an Handarterien bei Hämodialysepatienten ist beschrieben worden. In dieser Studie wird bereits auf eine FGF-23- Pro-

duktion transdifferenzierter VSMCs und auf eine protektive Wirkung bezüglich der Entwicklung einer Mediasklerose spekuliert: "This raises the possibility of a protective effect of FGF-23 against the development of medial calcification of the hand artery."¹⁶⁴.

Eine molekulare Erklärung für diese Phänomene könnte die Verbindung von FGF-23 und Egr-1 (early growth response-1) sein. Egr-1 ist ein Schlüsselmolekül, welches mehr als 300 Gene im Rahmen der Atherogenese reguliert^{54, 76, 172}. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine intravenöse Gabe von FGF-23 zu einem Anstieg der Egr-1-Expression in der Niere führt⁹⁷.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob FGF-23 nicht auch die ubiquitär verteilten Natrium-Phosphat-Cotransporter vom Typ III in einer noch nicht bekannten Weise reguliert. Deren Aktivierung könnte beispielsweise den supraphysiologischen Phosphatkonzentrationen in Gefäßmuskelzellen der Atheroskleroseplaques entgegenwirken.

Bei der Interpretation unserer und anderer Studien muss berücksichtigt werden, dass die Bestimmung von FGF-23 nicht einheitlich erfolgt und der Zusammenhang zwischen Konzentration und biologischer Aktivität nicht immer klar ist. Obwohl nur das intakte Molekül von FGF-23 biologisch aktiv sein sollte, scheinen auch Fragmente des Proteins eine phosphaturische Wirkung zu haben⁶⁵. So bleibt offen, ob die von uns gemessenen Konzentrationen wirklich etwas über die biologische Aktivität aussagen. Fragen zur biologisch relevanten Degradation von FGF-23 und zur Aktivität der verschiedenen Fragmente des FGF-23 Moleküls sind noch nicht geklärt. Bereits bestehende Ergebnisse sollten gegebenenfalls in einigen Jahren erneut interpretiert werden^{84, 173}.

Ein immunhistochemischer Nachweis von FGF-23 gelang bis jetzt im Weichteiltumor eines TIO-Patienten¹⁷⁴ und bei Schafen im Rahmen der Knochenheilung nach experimentellen Frakturen¹⁶¹. Wir konnten FGF-23 in der Mehrzahl der Gefäßpräparate nachweisen: zum einen häufig in den Schulterregionen der die Gefäßwand auftreibenden Plaques, zum anderen in stark umgebauten Wandabschnitten, bei welchen das VSMC-typische Antigen SMA als Zeichen nativer Gefäßmuskelzellen nicht mehr nachweisbar war. Diese Färbesignale deuten auf eine lokale Synthese des Proteins hin.

Ob das Auftreten von Verkalkungen und FGF-23 positiven Zellen in einem unmittelbaren Zusammenhang steht, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht zu beantworten: Es zeigten sich keine eindeutigen Ansammlungen FGF-23 positiver Zellen in der Umgebung der Mineralisierungsbezirke. Gleichsam könnten die FGF-23 positiven Zellen, speziell in den Schulterregionen der Plaques, Zeichen eines Schutzmechanismus sein, der das Fortschreiten dortiger Mineralisierungsprozesse verhindern soll. FGF-23 scheint so an der weiteren Entwicklung der atherosklerotischen Plaques beteiligt zu sein.

Zum anderen passt die Expression von FGF-23 in Atheromen prima vista auch in das Konzept der ektopen enchondralen Ossifikation von Arterien, da osteogene Zellen ohnehin die

physiologischen Produzenten sind. Insofern könnte das synthetisierte FGF-23 eines unter vielen osteogenen Proteinen sein, die nach Differenzierung der VSMCs von der kontraktilen zur sezernierenden Zelle produziert werden. Andererseits könnte es sich auch, wie erwähnt, um die gezielte Produktion eines potenten Modulators der Verkalkung während des Fortschreitens der Atherosklerose handeln. So ist beschrieben, dass eine Überexpression von FGF-23 die Differenzierung in der Osteoblastenentwicklung und die Mineralisation der Matrix *in vitro* hemmt¹⁷⁵.

Ähnlich wie beim Fetuin-A bleibt aber zu klären, ob FGF-23 wirklich von den veränderten Gefäßzellen selbst produziert wird oder ob es aus dem systemischen Kreislauf in die teils vorgeschädigten Gefäßwände und deren Zellen eindringt bzw. aktiv aufgenommen wird. Es könnte letzterenfalls zu einer entsprechenden Steigerung der physiologischen Synthese in bzw. Freisetzung von FGF-23 aus den Knochenzellen kommen.

Darüber hinaus besteht zwischen dem Nachweis von FGF-23 in der Gefäßwand und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation, der HDL-Konzentration und der Raucheranamnese eine signifikante Assoziation. Die Assoziation zwischen FGF-23 und der HDL-Konzentration im Blut ist wohl in gleicher Weise wie die zwischen Fetuin-A und HDL zu sehen. Wenn das Auftreten FGF-23 positiver Zellen ein Zeichen weit fortgeschrittener Plaques ist, könnten die höheren HDL-Werte bei Patienten mit FGF-23 negativen Präparaten Ausdruck einer HDL-assoziierten Vaskuloprotektion sein. Während die Tatsache, dass FGF-23 negative Präparate eher bei älteren Patienten (höheres Alter als atherosklerotischer Risikofaktor) zu finden waren, sich nicht schlüssig in diese Theorie einfügen lässt, passt das Ergebnis der Berechnung für die Zigarettenbelastung (bzw. pack years) sehr wohl. Eine hohe Anzahl an pack years ist signifikant mit dem Auftreten FGF-23 positiver Präparate assoziiert. Die bereits beschriebene positive Korrelation zwischen der FGF-23-Serumkonzentration und der Raucheranamnese könnte demnach mit der lokalen Synthese des Proteins im geschädigten Gefäßsystem mit seinen transdifferenzierten Zellen begründet sein.

Während die Expression von FGFR-1 als Bestandteil des heterodimeren FGF-23-Rezeptors in der Gefäßwand bereits bekannt ist¹⁷⁶, konnten wir in unseren Präparaten auch Klotho in den zu FGF-23 korrespondierenden Arealen nachweisen. Damit sind alle für die Wirkung von FGF-23 essentiellen Komponenten in den Gefäßen präsent. Die oben aufgeworfene Frage nach der Wirkung auf die ubiquitär verteilten Natrium-Phosphat-Cotransporter vom Typ III oder andere Transporter in der Gefäßwand erscheint demnach umso bedeutsamer.

Eine phosphatreduzierte Diät kann den Alterungsprozess und die exzessive Gefäßverkalkung bei FGF-23 oder/und Klotho defizitären Mäusen aufhalten. Phosphat ist bei Knochenerkrankungen, bei der Gefäßverkalkung und der chronischen Niereninsuffizienz von großer Bedeutung und das anorganische Phosphat hat Auswirkungen auf den Glucose/Insulinstoffwechsel und verursacht oxidativen Stress. Die FGF-23/Klotho vermittelte Aufrechterhaltung

einer Phosphathomöostase ist somit ein Grundpfeiler zur Vermeidung frühzeitiger Alterungserscheinungen.

Klotho, welches immunhistochemisch bis jetzt beispielsweise in Nebenschilddrüsengewebe nachgewiesen werden konnte, kommt noch eine andere, das Gefäßsystem betreffende Funktion zu. Es hemmt die H₂O₂ induzierte Apoptose von Gefäßendothelzellen in vitro^{177, 178}.

5.6 Fetuin-A, FGF-23 und Mineralisation

Mineralisationsvorgänge im Organismus brauchen eigentlich immer eine Regulation bzw. aktive Inhibition^{19, 34}. Zahlreiche Faktoren sind notwendig um, wie im Knochen, ein reguläres Kristallwachstum zu ermöglichen. Hierfür sind professionelle Matrix-mineralisierende Zellen und ein geeignetes Gerüst obligat. Mineralnanokristalle in Blutgefäßen sind hinsichtlich Gestalt und Größe viel variabler und weniger organisiert als im Knochen. Grund hierfür könnte die geringere Kontrolle der Kristallformation sein¹⁷⁹. Fetuin-A ist in diesem Szenario für die Bereitstellung kleiner Calciumphosphatkristalle zuständig. Fetuin-A-Mangelzustände könnten zu ungeordneter Präzipitation führen und eine strukturierte Matrix mit fest ausgebildeten Kristallen verhindern.

In diesem Konzept ist Fetuin-A zeitlich vor FGF-23 im Gewebe wirksam und so könnte es im Gegensatz zu FGF-23 noch, wie von uns beschrieben, zusammen mit SMA in den Gefäßwandzellen zu finden sein. FGF-23 käme im weiteren Fortschreiten der Verkalkung eine regulierende Wirkung zu, indem es supraphysiologischen Phosphatkonzentrationen in der Arterienwand entgegenwirkte.

5.7 Kritische Betrachtung der Studie

Im Verlauf der Untersuchungen traten einige Aspekte der Studie zu Tage, die bei der Ergebnisinterpretation Berücksichtigung finden sollten. So entstanden aus der Querschnittsstudie heraus mehrere Kollektive innerhalb der Patientengruppe. Studienpatienten mit „klassischer“ Atherosklerose und Patienten mit zusätzlicher Nierenfunktionseinschränkung und/oder Diabetes mellitus wurden in die Untersuchungen einbezogen. Da die unterschiedlichen Risikofaktoren, u.a. durch das fortgeschrittenere Alter der Patienten bedingt, fast nie einzeln auftraten, war eine klare Separierung der verschiedenen Faktoren kaum möglich.

Altersabhängig kommt es zudem auch zur Potentierung der Risikofaktoren in ihrer Auswirkung auf das Fortschreiten der Gefäßveränderungen. So könnte etwa ein langjährig bestehender Diabetes mellitus den Progress der Atherosklerose beschleunigen und die Verkalkungen modifizieren.

Weiterhin ist zu betonen, dass es sich bei den histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen immer nur um eine Momentaufnahme handelt, die zudem auf einen kleinen Querschnitt des gesamten Arteriensystems beschränkt ist. Ver-

allgemeinerungen gelten demnach auch hier unter Vorbehalt. Ob sich FGF-23 z.B. auch in Femoralarterien findet, ist nicht bekannt. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass immunhistochemische Untersuchungen allenfalls semiquantitativ sind. Daher haben wir bewusst auf Aussagen zur Intensität von Färbesignalen verzichtet. Auch wenn alle Präparate mit der gleichen Charge der Primärantikörper und nach identischen Protokollen angefärbt wurden, sind Unterschiede, die z.B. durch Temperaturschwankungen, Luftfeuchtigkeit, Präparateeinbettung oder unterschiedliche Chemikalienchargen entstanden sind, nicht zu vermeiden.

Die Resultate der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind aufgrund der Beschränkung auf lediglich ein Präparat sicherlich mit Vorsicht zu interpretieren. Während sich die Ergebnisse für SMA und Fetuin-A durchaus in die bekannten Theorien einfügen lassen, ist die Einordnung der FGF-23-Färbung schwieriger.

Trotz aller Limitationen hat die Studie gezeigt, dass Fetuin-A und FGF-23 auch lokal in verkalkten Gefäßen zu finden und mit großer Wahrscheinlichkeit aktiv an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind. Unsere Ergebnisse passen sehr gut zu dem kürzlich vorgestellten Modell der „Verkalkung durch Ausschluss der Inhibitoren“^{47, 152, 153}. Demzufolge gewährleistet Fetuin-A eine geordnete Verkalkung und ist bereits nachweisbar, wenn die Gefäßwand nur minimal verändert ist. Die Aufgabe von FGF-23 bestünde dann weniger darin, die ohnehin nicht mehr aufzuhaltenen Verkalkungen, sondern vielmehr die Akkumulation von Phosphat zu verhindern.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine Erkrankung der größeren und mittleren Arterien und trägt in den Industrieländern ganz wesentlich dazu bei, dass Herzinfarkte und Schlaganfälle die häufigsten Todesursachen sind. Zu den Ursachen einer arteriellen Gefäßverkalkung zählen sowohl mit der Lebensweise assoziierte Faktoren als auch verschiedene Erkrankungen, die durch eine chronische (Mikro-)Inflammation mit Verschiebungen des metabolischen Gleichgewichts gekennzeichnet sind.

Fetuin-A und der Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) sind zwei wichtige Mediatoren der orthotopen und ektopen Mineralisation. Fetuin-A verhindert als Trägerprotein für Calciumphosphat die Bildung unlöslicher Calciumphosphate in der Zirkulation und sorgt gleichzeitig für den Transport dieser Verbindungen zu den Orten der Mineralisation. FGF-23 ist weniger als ein Wachstumsfaktor, sondern vielmehr als ein Hormon anzusehen und bildet mit Vitamin D und Parathormon den Regelkreis für die Calcium- und Phosphathomöostase. Beide Proteine wurden bislang im wesentlichen im Rahmen der für eine chronische Niereninsuffizienz typischen Aberrationen im Calcium- und Phosphatstoffwechsel betrachtet und mit atherosklerotischen Veränderungen bei diesen Patienten in Verbindung gebracht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße diese Proteine auch bei der „klassischen“ Atherosklerose eine Rolle spielen. Hierzu wurden bei Patienten, die sich einer Carotisendarteriektomie unterzogen haben, die Konzentrationen von Fetuin-A und FGF-23 im Blut und parallel dazu die Verteilung beider Proteine in den Operationspräparaten untersucht.

Im Median betrug die Fetuin-A-Serumkonzentration 0,389 g/l und war damit etwas niedriger als in anderen Studien mit vergleichbarer Patientenpopulation beschrieben. Weiterhin zeigten sich positive Korrelationen mit dem Körpergewicht sowie den Serumkonzentrationen von Phosphat und Albumin. Bei 50 von 80 Patienten lagen die Konzentrationen des c-terminalen Fragments von FGF-23 (cFGF-23) oberhalb der Nachweisgrenze und bei diesen Patienten betrug die cFGF-23-Konzentration im Median 85 RU/ml. Die cFGF-23-Konzentrationen waren signifikant positiv mit der Dauer des Nikotinabusus assoziiert. Zwischen der Serumkonzentration von FGF-23 und dem Ausmaß der morphologisch nachweisbaren Gefäßverkalkung einerseits und der Fetuin-A-Serumkonzentration andererseits bestanden tendenziell signifikante positive bzw. negative Assoziationen.

Anhand der von Kossa-Färbung wurden 59 von 80 Präparaten als stark verkalkt und 21 Präparate als gering verkalkt klassifiziert. Marker der Chondrogenese (SOX-9, Kollagen II)

und Osteogenese (Cathepsin-K, TRAP) ließen sich in 51, 58, 59 und 28 der stark verkalkten sowie in 15, 21, 20 und 7 der gering verkalkten Präparate immunhistochemisch/histologisch nachweisen.

Fetuin-A konnte in allen Präparaten immunhistochemisch extra- und/oder intrazellulär und auch in größerer Entfernung zu atherosklerotisch veränderten Arealen nachgewiesen werden. Diese Interpretation wurde durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Fetuin-A und SMA bzw. Kollagen Typ II und elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt. Demgegenüber waren FGF-23 positive Zellen nur in 69 von 80 Präparaten und dort nahezu ausschließlich in stark veränderten Arealen detektierbar. In diesen Arealen liess sich auch Klotho als der für die Wirkung von FGF-23 notwendige Corezeptor immunhistochemisch nachweisen.

Damit sind beide Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit, wenn auch zeitlich versetzt, für den Verkalkungsprozess bedeutsam. Sobald eine für die Mineralisierung geeignete Matrix vorhanden ist, sorgt Fetuin-A durch den Transport und die dosierte Freisetzung von Calciumphosphaten in die Extrazellulärmatrix für die Bildung einer kristallinen mineralischen Phase. In diesem Szenario würde FGF-23 in Verbindung mit seinem Corezeptor Klotho zu einem späteren Zeitpunkt die Akkumulation von Phosphat verhindern und so zur Entstehung einer geordneten mineralischen Phase beitragen.

7 Thesen

1. Die Fetuin-A-Serumkonzentrationen in unserem Patientenkollektiv mit Atherosklerose sind im Vergleich mit früheren Studien eher niedrig und korrelieren positiv mit der Albumin- und Phosphatkonzentration sowie mit dem Körpergewicht der Patienten.
2. In 50 von 80 Blutproben lagen die cFGF-23-Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze und die Werte korrelieren positiv mit der Raucheranamnese.
3. Blutproben mit nicht messbarer cFGF-23-Konzentration wiesen höhere Fetuin-A-Serumkonzentrationen auf ($p < 0,05$ bei Korrelationsberechnung nach Spearman).
4. Die entnommenen Gefäßpräparate sind bis auf wenige Ausnahmen ausgeprägt bindegewebig umgebaut und alle Gefäßproben weisen eine Form der Verkalkung auf. Hierbei findet sich in 59 der 80 Präparate mindestens eine Verkalkungsläsion, welche die Gefäßwandschichten auseinanderdrängt.
5. Chondro- und osteogene Marker sind in der überwiegenden Mehrzahl der Gefäße nachweisbar und bekräftigen damit die Theorie einer enchondralen Ossifikation in atherosklerotischen Plaques.
6. Fetuin-A kann immunhistochemisch in allen Präparaten entweder nur extrazellulär oder extra- und intrazellulär nachgewiesen werden. Präparate mit extra- und intrazellulärer Anfärbung von Fetuin-A stammen bevorzugt von Patienten mit arterieller Hypertonie ($p < 0,05$), niedrigem HDL-Cholesterin ($p < 0,01$) und hoher Harnstoff-Serumkonzentration ($p < 0,05$).
7. Die Doppelfärbungen von Fetuin-A und Kollagen II bzw. SMA und die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen auf eine wichtige Funktion von Fetuin-A bei Verkalkungsprozessen in atherosklerotischen Gefäßwänden hin.
8. In dieser Arbeit konnten erstmalig FGF-23 positive Zellen in 69 von 80 Gefäßpräparaten identifiziert werden. FGF-23 negative Präparate stammen überwiegend von älteren Patienten mit einer geringen Nikotinbelastung und höherem HDL-Cholesterin ($p < 0,05$).
9. Die Doppelfärbungen von FGF-23 und SMA und die Detektion des Corezeptors Klotho in identischen Gefäßwandarealen sprechen für eine lokale Funktion von FGF-23 in der atherosklerotischen Gefäßwand.

8 Literaturverzeichnis

1. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1161-1170.
2. DelleGrottaglie S, Sanz J, Rajagopalan S. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2006;24(1):56-62.
3. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1997;51(6):1678-1695.
4. Diener H, Larena-Avellaneda A, Debus ES. [Postoperative complications in vascular surgery]. *Chirurg.* 2009;80(9):814-826.
5. Böcker WD, H; Heitz, P.U. *Pathologie.* München: Urban&Fischer Verlag; 2000.
6. Sessa R, Nicoletti M, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino I, Zagaglia C, Del Piano M, Cipriani P. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: current state and future prospectives. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009;22(1):9-14.
7. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295(7):369-377.
8. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1976;295(8):420-425.
9. Bryan RM, Jr., You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 2005;102(6):1261-1277.
10. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: nature's blood-compatible container. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516:5-11.
11. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(1):333-337.
12. Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(7):4569-4572.
13. McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(5 Suppl):1307S-1315S.
14. Stocker R, Kearney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-1478.
15. Libby P, Geng YJ, Sukhova GK, Simon DI, Lee RT. Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;811:134-142; discussion 142-135.

16. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones.* 2007;39(2):86-93.
17. El-Abbadi M, Giachelli CM. Mechanisms of vascular calcification. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2007;14(1):54-66.
18. Mody N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. Vascular calcification and its relation to bone calcification: possible underlying mechanisms. *J Nucl Cardiol.* 2003;10(2):177-183.
19. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation.* 2008;117(22):2938-2948.
20. Raggi P, Giachelli C, Bellasi A. Interaction of vascular and bone disease in patients with normal renal function and patients undergoing dialysis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4(1):26-33.
21. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006;4(6):801-811.
22. Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* 2006;36 Suppl 2:51-62.
23. Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H. Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int.* 2007;18(3):251-259.
24. Quarles LD. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(1):E1-9.
25. Epple MBE. *Handbook of Biomineralization.* 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
26. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol.* 1997;137(5):1149-1160.
27. Magne D, Julien M, Vinatier C, Merhi-Soussi F, Weiss P, Guicheux J. Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays.* 2005;27(7):708-716.
28. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. II. Animal studies. *J Exp Pathol.* 1986;2(4):275-297.
29. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol.* 1986;2(4):261-273.
30. Hsu HH, Camacho NP, Anderson HC. Further characterization of ATP-initiated calcification by matrix vesicles isolated from rachitic rat cartilage. Membrane perturbation by detergents and deposition of calcium pyrophosphate by rachitic matrix vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1416(1-2):320-332.

31. King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM. Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11661-11669.
32. Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation.* 2002;106(24):3044-3050.
33. Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(5 Suppl):1297S-1306S.
34. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* 2009;75(9):890-897.
35. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87(7):E10-17.
36. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(11):2857-2867.
37. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004;66(6):2293-2299.
38. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(6):525-531.
39. Suliman ME, Garcia-Lopez E, Anderstam B, Lindholm B, Stenvinkel P. Vascular calcification inhibitors in relation to cardiovascular disease with special emphasis on fetuin-A in chronic kidney disease. *Adv Clin Chem.* 2008;46:217-262.
40. Denecke B, Graber S, Schafer C, Heiss A, Woltje M, Jahnen-Dechent W. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):135-145.
41. Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schafer C, Jahnen-Dechent W. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14815-14825.
42. Weissen-Plenz G, Nitschke Y, Rutsch F. Mechanisms of arterial calcification: spotlight on the inhibitors. *Adv Clin Chem.* 2008;46:263-293.
43. Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M, McKee MD. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med.* 2008;86(4):379-389.

44. Rochette CN, Rosenfeldt S, Heiss A, Narayanan T, Ballauff M, Jahnen-Dechent W. A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study. *Chembiochem*. 2009;10(4):735-740.
45. Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Chen NX. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int*. 2005;67(6):2295-2304.
46. Price PA, Toroian D, Chan WS. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of collagen in serum: a possible mechanism for biomineralization. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4594-4604.
47. Price PA, Toroian D, Lim JE. Mineralization by inhibitor exclusion: the calcification of collagen with fetuin. *J Biol Chem*. 2009;284(25):17092-17101.
48. Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Muller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem*. 1997;272(50):31496-31503.
49. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnen-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*. 2003;112(3):357-366.
50. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-A (AHSR) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003;361(9360):827-833.
51. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int*. 2005;67(6):2383-2392.
52. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(8):1676-1685.
53. Hermans MM, Brandenburg V, Ketteler M, Kooman JP, van der Sande FM, Boeschoten EW, Leunissen KM, Krediet RT, Dekker FW. Association of serum fetuin-A levels with mortality in dialysis patients. *Kidney Int*. 2007;72(2):202-207.
54. Danziger J. The bone-renal axis in early chronic kidney disease: an emerging paradigm. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(9):2733-2737.
55. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008;100(4):593-603.

56. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1610-1616.
57. Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ketteler M, Whooley MA. Fetuin-A and kidney function in persons with coronary artery disease--data from the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(8):2144-2151.
58. Caglar K, Yilmaz MI, Saglam M, Cakir E, Kilic S, Eyileten T, Sonmez A, Oguz Y, Oner K, Ors F, Vural A, Yenicesu M. Endothelial dysfunction and fetuin A levels before and after kidney transplantation. *Transplantation.* 2007;83(4):392-397.
59. Auburger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Le Cam G, Rossi B, Le Cam A. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell.* 1989;58(4):631-640.
60. Mathews ST, Srinivas PR, Leon MA, Grunberger G. Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci.* 1997;61(16):1583-1592.
61. Mathews ST, Chellam N, Srinivas PR, Cintron VJ, Leon MA, Goustin AS, Grunberger G. Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;164(1-2):87-98.
62. Mathews ST, Rakhade S, Zhou X, Parker GC, Coscina DV, Grunberger G. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350(2):437-443.
63. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, Cintron VJ, Qiang X, Goustin AS, Jen KL, Charron MJ, Jahnen-Dechent W, Grunberger G. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes.* 2002;51(8):2450-2458.
64. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation.* 2006;113(14):1760-1767.
65. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, Lanske B, Sitara D, Razzaque MS, Pragnell M, Bowe AE, O'Brien SP, Schiavi SC, Kumar R. Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch.* 2007;454(4):615-623.
66. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(6):F1170-1182.
67. White KE, Larsson TE, Econs MJ. The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev.* 2006;27(3):221-241.

68. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6500-6505.
69. ADHR-Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet*. 2000;26(3):345-348.
70. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Juppner H, Jonsson KB. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 2004;145(7):3087-3094.
71. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):409-414.
72. Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, Juppner H, Lanske B. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biol*. 2004;23(7):421-432.
73. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology*. 2002;143(8):3179-3182.
74. Rimmucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ, Bianco P, Gheron Robey P. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest*. 2003;112(5):683-692.
75. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N. Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone*. 2007;40(6):1565-1573.
76. Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol*. 2007;194(1):1-10.
77. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004;19(3):429-435.
78. Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology*. 2004;145(11):5269-5279.

79. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(6):G1036-1042.
80. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(1):E38-49.
81. Antonucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3144-3149.
82. Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1519-1524.
83. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Takeda S, Suzuki H, Yamashita T, Fujita T. Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF)23 levels in humans. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(6):419-422.
84. Emmett M. What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis patients? *Kidney Int.* 2008;73(1):3-5.
85. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S112-119.
86. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(7):2205-2215.
87. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 2003;64(6):2272-2279.
88. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, Miura M, Miyauchi A, Kobayashi K, Miki T, Shoji T, Ishimura E, Nishizawa Y. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004;65(5):1943-1946.
89. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(2):F282-291.
90. Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(12):2342-2350.
91. Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(31):28265-28270.

92. Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, Caverzasio J. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone*. 2002;30(1):91-98.
93. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol*. 1999;185:45-106.
94. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem*. 2008;389(3):233-241.
95. Torres PU, Prie D, Molina-Bletry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int*. 2007;71(8):730-737.
96. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6120-6123.
97. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-774.
98. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R, Mohammadi M, White KE, Econs MJ. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2684-2691.
99. Memon F, El-Abbadi M, Nakatani T, Taguchi T, Lanske B, Razzaque MS. Does Fgf23-klotho activity influence vascular and soft tissue calcification through regulating mineral ion metabolism? *Kidney Int*. 2008;74(5):566-570.
100. Kiela PR, Ghishan FK. Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. *Lab Invest*. 2009;89(1):7-14.
101. Prie D, Urena Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int*. 2009;75(9):882-889.
102. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*. 2005;310(5747):490-493.
103. Marsell R, Krajisnik T, Goransson H, Ohlsson C, Ljunggren O, Larsson TE, Jonsson KB. Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):827-833.
104. Bancroft J, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. : Elsevier; 2007.
105. Voigt M, Fischer DC, Rimpau M, Schareck W, Haffner D. Fibroblast growth factor (FGF)-23 and fetuin-A in calcified carotid atheroma. *Histopathology*. 2010;56(6):775-788.
106. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(4 Suppl 3):S1-201.

107. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-1252.
108. Ritz E, Dikow R. Hypertension and antihypertensive treatment of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(10):562-567.
109. Maione A, Annemans L, Strippoli G. Proteinuria and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2009;22(11):1137-1147.
110. Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 2006;113(24):e873-923.
111. Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ*. 1994;309(6946):11-15.
112. Koschinsky ML. Lipoprotein(a) and atherosclerosis: new perspectives on the mechanism of action of an enigmatic lipoprotein. *Curr Atheroscler Rep*. 2005;7(5):389-395.
113. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation*. 2000;102(10):1082-1085.
114. Fagerstrom K. The epidemiology of smoking: health consequences and benefits of cessation. *Drugs*. 2002;62 Suppl 2:1-9.
115. Kool MJ, Hoeks AP, Struijker Boudier HA, Reneman RS, Van Bortel LM. Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22(7):1881-1886.
116. Thun MJ, Apicella LF, Henley SJ. Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom. *JAMA*. 2000;284(6):706-712.
117. Howard G, Wagenknecht LE, Cai J, Cooper L, Kraut MA, Toole JF. Cigarette smoking and other risk factors for silent cerebral infarction in the general population. *Stroke*. 1998;29(5):913-917.
118. Robert-Koch-Institut SB. *Rauchverhalten 2002/2003, Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Datenerhebung: Telefonischer Gesundheitssurvey) 2006*.
119. Fisher M, Paganini-Hill A, Martin A, Cosgrove M, Toole JF, Barnett HJ, Norris J. Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis. *Stroke*. 2005;36(2):253-257.

120. Bobryshev YV. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2005;180(2):293-303.
121. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-1374.
122. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1262-1275.
123. Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, Cao D, Desai T, Glagov S, Bassiouny HS. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg*. 2004;40(2):262-269.
124. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(8):1852-1861.
125. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int*. 2002;61(2):638-647.
126. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2393-2402.
127. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:63-68.
128. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):1998-2003.
129. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res*. 2005;97(2):105-114.
130. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER, 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke*. 2002;33(5):1214-1219.
131. Platt MO, Ankeny RF, Shi GP, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Jo H. Expression of cathepsin K is regulated by shear stress in cultured endothelial cells and is increased in endothelium in human atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(3):H1479-1486.

132. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):489-494.
133. Neven E, Dauwe S, De Broe ME, D'Haese PC, Persy V. Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int.* 2007;72(5):574-581.
134. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11201-11206.
135. Massy ZA, Mentaverri R, Mozar A, Brazier M, Kamel S. The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes Metab.* 2008;34 Suppl 1:S16-20.
136. Ix JH, Shlipak MG, Sarnak MJ, Beck GJ, Greene T, Wang X, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS, Menon V. Fetuin-A is not associated with mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2007;72(11):1394-1399.
137. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(4):337-342.
138. Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost HG, Haring HU, Boeing H, Fritsche A. Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation.* 2008;118(24):2555-2562.
139. Wigger M, Schaible J, Muscheites J, Kundt G, Haffner D, Fischer DC. Fetuin-A serum concentrations in healthy children. *Ann Clin Biochem.* 2009;46(Pt 6):511-513.
140. Oikawa O, Higuchi T, Yamazaki T, Yamamoto C, Fukuda N, Matsumoto K. Evaluation of serum fetuin-A relationships with biochemical parameters in patients on hemodialysis. *Clin Exp Nephrol.* 2007;11(4):304-308.
141. Reinehr T, Roth CL. Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4479-4485.
142. Hennige AM, Staiger H, Wicke C, Machicao F, Fritsche A, Haring HU, Stefan N. Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PLoS One.* 2008;3(3):e1765.
143. Cozzolino M, Galassi A, Biondi ML, Turri O, Papagni S, Mongelli N, Civita L, Gallieni M, Brancaccio D. Serum fetuin-A levels link inflammation and cardiovascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2006;26(5):423-429.
144. Mehrotra R, Westenfeld R, Christenson P, Budoff M, Ipp E, Takasu J, Gupta A, Norris K, Ketteler M, Adler S. Serum fetuin-A in nondialyzed patients with diabetic nephropathy: relationship with coronary artery calcification. *Kidney Int.* 2005;67(3):1070-1077.

145. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2006;29(2):468.
146. Ix JH, Wassel CL, Kanaya AM, Vittinghoff E, Johnson KC, Koster A, Cauley JA, Harris TB, Cummings SR, Shlipak MG. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008;300(2):182-188.
147. Mori K, Emoto M, Araki T, Yokoyama H, Teramura M, Lee E, Motoyama K, Koyama H, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y. Association of serum fetuin-A with carotid arterial stiffness. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66(2):246-250.
148. Fiore CE, Celotta G, Politi GG, Di Pino L, Castelli Z, Mangiafico RA, Signorelli SS, Pennisi P. Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):110-115.
149. Kaden JJ, Kilic R, Sarikoc A, Hagl S, Lang S, Hoffmann U, Brueckmann M, Borggrefe M. Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med*. 2005;16(5):869-872.
150. Martens FM, Rabelink TJ, op 't Roodt J, de Koning EJ, Visseren FL. TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone. *Eur Heart J*. 2006;27(13):1605-1609.
151. Ombrellino M, Wang H, Yang H, Zhang M, Vishnubhakat J, Frazier A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock*. 2001;15(3):181-185.
152. Toroian D, Lim JE, Price PA. The size exclusion characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22437-22447.
153. Toroian D, Price PA. The essential role of fetuin in the serum-induced calcification of collagen. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(2):116-126.
154. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnchen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):2920-2930.
155. Epple M, Lanzer P. How much interdisciplinarity is required to understand vascular calcifications? Formulation of four basic principles of vascular calcification. *Z Kardiol*. 2001;90 Suppl 3:2-5.
156. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(6):1392-1401.

157. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81.
158. O'Neill WC. Vascular calcification: not so crystal clear. *Kidney Int*. 2007;71(4):282-283.
159. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2008;359(6):584-592.
160. Yamashita H, Noguchi S, Yamasaki Y, Hasegawa H, Yamashita T, Fukumoto S, Shigematsu T, Kazama J, Fukagawa M. [Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with hypoparathyroidism]. *Clin Calcium*. 2005;15 Suppl 1:41-45; discussion 45.
161. Goebel S, Lienau J, Rammoser U, Seefried L, Wintgens KF, Seufert J, Duda G, Jakob F, Ebert R. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J Orthop Res*. 2009;27(9):1141-1146.
162. Imel EA, Hui SL, Econs MJ. FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *J Bone Miner Res*. 2007;22(4):520-526.
163. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(9):2792-2796.
164. Inaba M, Okuno S, Imanishi Y, Yamada S, Shioi A, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Role of fibroblast growth factor-23 in peripheral vascular calcification in non-diabetic and diabetic hemodialysis patients. *Osteoporos Int*. 2006;17(10):1506-1513.
165. Kojima F, Uchida K, Ogawa T, Tanaka Y, Nitta K. Plasma levels of fibroblast growth factor-23 and mineral metabolism in diabetic and non-diabetic patients on chronic hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2008;40(4):1067-1074.
166. Zoccali C. FGF-23 in dialysis patients: ready for prime time? *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(4):1078-1081.
167. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, Fukagawa M. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 2004;44(2):250-256.
168. Westerberg PA, Linde T, Wikstrom B, Ljunggren O, Stridsberg M, Larsson TE. Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(11):3202-3207.
169. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*. 2009;119(19):2545-2552.

170. Roos M, Lutz J, Salmhofer H, Luppa P, Knauss A, Braun S, Martinof S, Schomig A, Heemann U, Kastrati A, Hausleiter J. Relation between plasma fibroblast growth factor-23, serum fetuin-A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(4):660-665.
171. Fukagawa M, Kazama JJ. FGF23: its role in renal bone disease. *Pediatr Nephrol*. 2006;21(12):1802-1806.
172. Khachigian LM. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res*. 2006;98(2):186-191.
173. Fassbender WJ, Brandenburg V, Schmitz S, Sandig D, Simon SA, Windolf J, Stumpf UC. Evaluation of human fibroblast growth factor 23 (FGF-23) C-terminal and intact enzyme-linked immunosorbent-assays in end-stage renal disease patients. *Clin Lab*. 2009;55(3-4):144-152.
174. Ogura E, Kageyama K, Fukumoto S, Yagihashi N, Fukuda Y, Kikuchi T, Masuda M, Suda T. Development of tumor-induced osteomalacia in a subcutaneous tumor, defined by venous blood sampling of fibroblast growth factor-23. *Intern Med*. 2008;47(7):637-641.
175. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):939-948.
176. Hughes SE. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem*. 1997;45(7):1005-1019.
177. Bjorklund P, Krajisnik T, Akerstrom G, Westin G, Larsson TE. Type I membrane klotho expression is decreased and inversely correlated to serum calcium in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4152-4157.
178. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(3):827-832.
179. Becker A, Epple M, Muller KM, Schmitz I. A comparative study of clinically well-characterized human atherosclerotic plaques with histological, chemical, and ultrastructural methods. *J Inorg Biochem*. 2004;98(12):2032-2038.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Haffner danke ich für das interessante Thema und die inspirierende Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. D.-C. Fischer danke ich für den unkomplizierten Einstieg in das Thema und die intensive wie hartnäckige, geduldige wie innovative, vor allem aber nimmermüde und zielstrebige Betreuung über den gesamten Zeitraum.

Den Gefäßchirurgen und dem OP-Personal der Chirurgischen Universitätsklinik Rostock danke ich für die gute und kontinuierliche Unterstützung hinsichtlich der Patienten, deren Blutproben und Gefäßpräparaten.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für die zuverlässige und zügige Einbettung der Präparate und für die großzügige Bereitstellung der immunhistochemischen Kontrollgewebe.

Danken möchte ich zudem den Antragstellern des Forschungsvorhabens im Rahmen des Forum-Programmes für die interessante Fragestellung und die Bereitstellung des Stipendiums. Darüber hinaus danke ich Frau B. Steinig für die exzellenten photographischen Arbeiten sowie Frau Schulz und Frau S. Rackow für die Einbettung und Herstellung der Präparate für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Die Elektronenmikroskopie und Auswertung der Bilder in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Ing. G. Fulda habe ich als sehr wertvolle Erfahrung empfunden.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn PD Dr. med. H. Jastrow (Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen) für die Hilfe bei der Beschriftung der elektronenmikroskopischen Abbildungen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Anja Rahn und Birgit Salewski, die natürlich in erster Linie mit ihrer professionellen technischen Hilfe im Labor, aber auch mit ihrer stets warmherzigen Gesellschaft einen unersetzlichen Beitrag zu der Arbeit geleistet haben.

Letztlich bedanke ich mich aus vollem Herzen bei meiner Familie und meiner Frau, deren Unterstützung ich mir zu jedem Zeitpunkt meiner Ausbildung und Dissertation sicher sein konnte. In einem Leben ohne Euch, so viel steht fest, wäre jeder akademische Grad nur eine Aneinanderreihung von Buchstaben.