

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE

PROF. DR. BERNHARD BANAS

FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE KUTANE AUTOFLUORESZENZ ALS RISIKOFAKTOR UND PRÄDIKTOR
FÜR RENALE ENDPUNKTE BEI DIABETES MELLITUS TYP 2

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Konstantin Dumann

2017

Meiner Mutter

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE
PROF. DR. BERNHARD BANAS
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE KUTANE AUTOFLUORESZENZ ALS RISIKOFAKTOR UND PRÄDIKTOR
FÜR RENALE ENDPUNKTE BEI DIABETES MELLITUS TYP 2

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin Dumann

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Carsten Böger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Iris Heid
Tag der mündlichen Prüfung:	27.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Diabetes mellitus Typ 2 und Nierenkrankheit	1
1.1.1 Epidemiologie und Definition	1
1.1.2 Die Rolle von Biomarkern	2
1.2 Advanced Glycation Endproducts	3
1.2.1 Definition und Eigenschaften	3
1.2.2 Entstehung und Akkumulation	5
1.2.3 Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts	7
1.2.4 Effekte der Advanced Glycation Endproducts.....	7
1.2.5 Messmethoden für Advanced Glycation Endproducts	9
2. Fragestellung.....	10
3. Methoden	10
3.1 Studiendesign der DIACORE-Studie.....	10
3.2 Patientenrekrutierung.....	11
3.2.1 Einschlusskriterien	11
3.2.2 Ausschlusskriterien	12
3.2.3 Durchführung der Rekrutierung	12
3.3 Standardphänotypisierung	13
3.3.1 Körperliche Untersuchung	13
3.3.2 Befragung	13
3.3.3 Biosampling	14
3.3.4 Validierung.....	15
3.4 Messung der kutanen Autofluoreszenz	15
3.5 Definition der Endpunkte	17
3.6 Definition der Kovariaten	18
3.7 Statistische Methodik	19
4. Ergebnisse	20
4.1 Patientencharakteristika.....	20
4.2. Kutane Autofluoreszenz und renale Endpunkte: Querschnittsanalyse.....	24
4.2.1 eGFR	24

4.2.2 UACR.....	25
4.2.3 Albuminurie.....	26
4.2.4 CKD	27
4.3 Kutane Autofluoreszenz und renale Endpunkte: Longitudinale Analyse	28
4.3.1 Abnahme der eGFR pro Jahr.....	28
4.3.2 Rapid5	29
4.3.3 Rapid3	30
4.3.4 CKDi25	31
4.3.5 Neuauftretene Albuminurie	32
5. Diskussion	33
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	33
5.2 Im Kontext der aktuellen Forschung.....	34
5.3 Klinische Auswirkungen	38
5.4 Stärken und Grenzen dieser Arbeit	38
5.5 Zusammenfassung.....	39
6. Fazit	40
7. Anhang	41
7.1 Abkürzungsverzeichnis	41
7.2 Literaturverzeichnis	44
7.3 Danksagung.....	48
7.4 Eidesstattliche Erklärung.....	49

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2 und Nierenkrankheit

1.1.1 Epidemiologie und Definition

366 Millionen Menschen waren laut Schätzungen der International Diabetes Federation (IDF) im Jahr 2011 weltweit an Diabetes mellitus erkrankt. 2030 soll die globale Prävalenz bereits auf 552 Millionen angestiegen sein [1, 2]. Diese hohe Prävalenz, aber auch die damit verbundenen Ausgaben im Gesundheitssystem und die individuelle Belastung für die Erkrankten erklären, dass Diabetes seit Jahrzehnten im Fokus medizinischer Forschung steht [3-5].

Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine komplexe endokrine Erkrankung, in der es durch periphere Insulinresistenz zu einer Hyperglykämie kommt. Sie ist prädisponierend für mikrovaskuläre und makrovaskuläre Komplikationen wie die diabetische Nephro-, Neuro- und Retinopathie sowie kardiovaskuläre und periphere arterielle Verschlusskrankheit. Diabetes mellitus wird als Hauptursache für Erblindung, Amputationen der unteren Extremitäten, terminale Nierenerkrankung und kardiovaskuläre Erkrankungen in vielen Ländern angesehen [2, 6, 7]. Diabetische Nephropathie betrifft bis zu 40% aller Diabetespatienten [8]. 30% aller Patienten in Europa, bei denen eine Nierenersatztherapie begonnen wird, leiden an Diabetes mellitus [9]. Damit ist die diabetische Nephropathie eine der wichtigsten Gründe für Endstage Renal Disease (ESRD) [8], aber auch für die chronische Nierenkrankheit (CKD). Etwa 10 bis 13% der Gesamtbevölkerung leiden an CKD, in vielen Ländern steigt sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz [10, 11]. Definiert wird CKD hauptsächlich als eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) [12] (**Tabelle 1**). Häufig liegt bei der diabetischen Nephropathie, bevor es zu einer Abnahme der Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate), kommt, bereits eine erhöhte Albuminurie vor. Daher wird eine isoliert auftretende erhöhte Albuminurie bei Diabetikern oft als erstes Vorzeichen einer einsetzenden CKD gesehen [13, 14] und gilt als stärkster Prädiktor für die Entwicklung von Nierenschäden bei Diabetespatienten [15].

eGFR (ml/min/1,73m ²)	CKD – Klassifikation nach KDIGO
≥ 90	1*
60 – 89	2*
45 – 59	3a
30 – 44	3b
15 – 29	4
< 15	5

Tab. 1: Klassifikation von CKD nach eGFR gemäß der KDIGO- (Kidney Disease Improving Global Outcomes-) Leitlinie [16]. *: Bei einer eGFR dieser Höhe: CKD nur bei Vorliegen von funktionellen, strukturellen oder histologischen Zeichen einer chronischen Nierenschädigung.

1.1.2 Die Rolle von Biomarkern

1.1.2.1 Rationale zur Entdeckung neuer Biomarker für diabetische Nephropathie

Der prädiktive Wert der Albuminurie ist nur bedingt von Nutzen, da die Albuminurie selbst naturgemäß Zeichen und Folge einer bereits stattgehabten Nierenschädigung ist. Bei immer weiter steigenden Prävalenzraten für diabetische Nephropathie [17] gibt es bislang noch kaum effektive Strategien zur Prävention.

Neue Interventionsstudien legen nahe, dass die aktuelle medikamentöse Diabetestherapie durch toxische Effekte selbstlimitierend ist: Eine intensiviertere Blutdruck- und Blutzuckertherapie mit deutlich niedrigeren Zielwerten konnte zwar niedrigere Werte sowie ein späteres Einsetzen der Proteinurie erreichen, allerdings nur mit einer gleichzeitigen Zunahme von sog. unerwünschten Ereignissen (adverse events), unter anderem von kardiovaskulärer Mortalität und weiteren Nierenschäden [18-21]. Zudem wurde in den letzten 20 Jahren keine neue Medikamentenklasse gefunden, um die renalen Endpunkte in Hochrisikogruppen zu reduzieren [22]. Eventuell behandelbare Krankheitsmechanismen müssen also weiterhin erforscht werden, ebenso wie Diagnosemechanismen zur Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko für Nierenfunktionsschäden, um diese dann individuell therapieren zu können. So hat auch die Europäische Union in Ihrem „Inno-

vative Medicines Initiative 2“-Call einen Schwerpunkt auf die Erforschung von Biomarkern bei diabetischer Nephropathie gelegt [23].

1.1.2.2 HbA1c

Der wohl am weitesten verbreitete Biomarker bei Diabetes ist das HbA1c, mithilfe dessen sowohl eine gewisse Risikoprädiktion als auch eine Überprüfung des Therapieerfolgs erfolgen kann. Bei HbA1c handelt es sich um glykiertes Hämoglobin. Auch wenn die Häufigkeit des Auftretens diabetischer Komplikationen mit der Höhe des HbA1c-Wertes assoziiert ist, setzt die Limitierung des betrachteten Zeitfensters dem HbA1c auch Grenzen: Der HbA1c-Wert erlaubt durch die Halbwertszeit des Hämoglobins lediglich Rückschlüsse auf den Blutzuckerspiegel der vergangenen zwei bis drei Monate. Eine längerfristige Beurteilung ist nicht möglich [24-26].

1.2 Advanced Glycation Endproducts

1.2.1 Definition und Eigenschaften

Hyperglykämie ist bekanntermaßen die Hauptursache für diabetische Komplikationen. Die genaue Pathophysiologie, die dieser Kausalität zu Grunde liegt, ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt: Ein möglicher Mechanismus ist die durch den bei Diabetes erhöhten Glukosespiegel bedingte Proteinglykierung und die damit verbundene Akkumulation der entstehenden Produkte, der sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGEs). AGEs können also als Biomarker bei Diabetikern herangezogen werden, als Indikator für die Höhe des Glukosespiegels der vergangenen Monate – ähnlich wie der HbA1c-Wert, allerdings ohne die enge Limitation des betrachteten Zeitfensters von zwei bis drei Monaten [27].

Die Molekülgruppe der AGEs ist durch ihre gelblich-braune, fluoreszierende Farbe und durch die Fähigkeit, zwischen Aminogruppen Quervernetzungen zu bilden, charakterisiert [27, 28]. Man kann die heterogene Gesamtheit der AGEs in vier Gruppen einteilen (**Abbildungen 1-4**) [27]:

a) Fluoreszierende, quervernetzende AGEs:

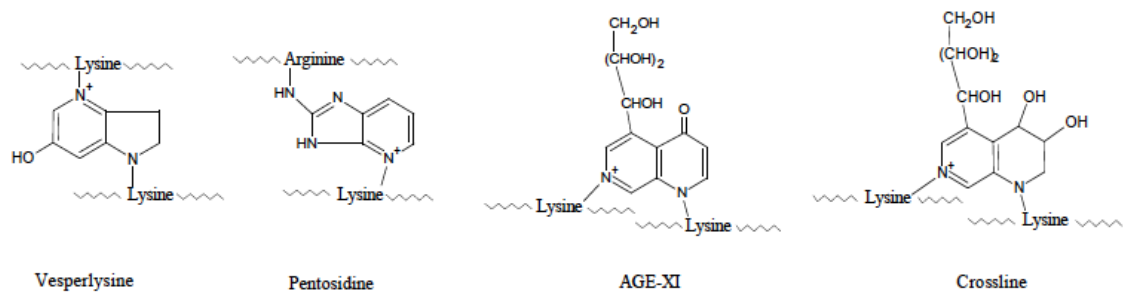


Abb. 1: Exemplarisch chemische Strukturformeln einiger fluoreszierender, quervernetzender AGEs. Quelle: [27].

b) Nicht-fluoreszierende, quervernetzende AGEs:

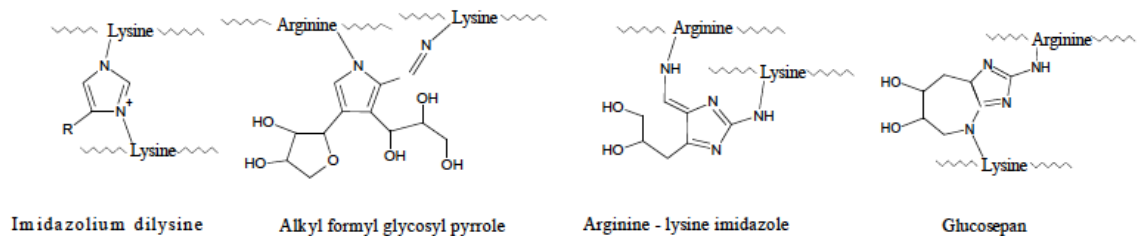


Abb. 2: Exemplarisch chemische Strukturformeln einiger nicht-fluoreszierender, quervernetzender AGEs. Quelle: [27].

c) Fluoreszierende, nicht-quervernetzende AGEs:

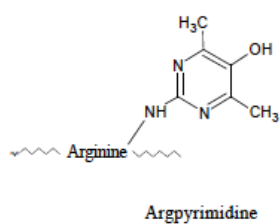


Abb. 3: Exemplarisch chemische Strukturformel eines fluoreszierenden, nicht-quervernetzenden AGE. Quelle: [27].

d) Nicht-fluoreszierende, nicht-quervernetzende AGEs:

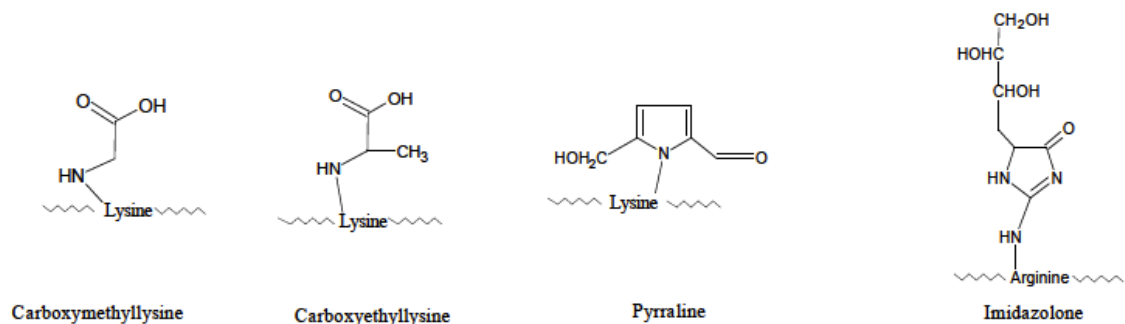


Abb. 4: Exemplarisch chemische Strukturformeln einiger nicht-fluoreszierender, nicht-quervernetzender AGEs. Quelle: [27].

Ob sich diese vier Gruppen, insbesondere fluoreszierende und nicht-fluoreszierende AGEs, bezüglich ihrer Toxizität und ihrer Wirkung auf Rezeptoren unterscheiden, ist bisher nicht bekannt.

1.2.2 Entstehung und Akkumulation

1912 beschrieb der französische Wissenschaftler Louis Camille Maillard erstmals die Bräunungsreaktion beim Erhitzen von Aminosäuren zusammen mit reduzierenden Zuckern [29]. Diese nicht-enzymatische Reaktion, nach ihrem Entdecker Maillard-Reaktion genannt, bildet die Grundlage der Entstehung von AGEs (**Abbildung 5**): Zunächst kommt es zu einer nukleophilen Addition zwischen einer freien Aminogruppe des Proteins und einer Carbonylgruppe des reduzierenden Zuckers. Es entsteht eine frei reversible Schiff-Base, die zu einem stabileren Ketoamin, dem sogenannten Amadori-Produkt weiter reagiert. Weitere Reaktionen führen über Dicarbonyl-Intermediate zu den stabilen AGEs [28, 30].

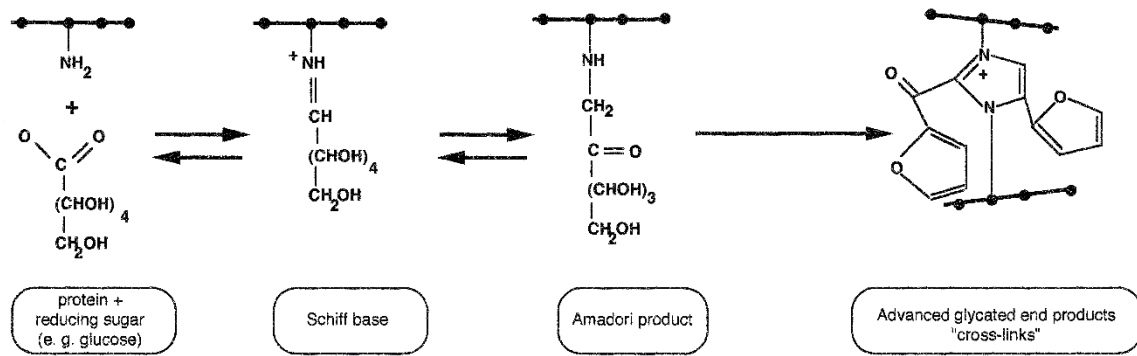


Abb. 5: Schematische Darstellung der AGE-Entstehung über Maillardreaktion. Quelle: [31].

Zwar entsteht auf diesem Weg der Großteil der AGEs, doch dürfen auch die diätisch aufgenommenen AGEs nicht außer Acht gelassen werden. So wurde ein deutlicher Anstieg der im Serum gemessenen AGEs nach dem Verzehr einer Mahlzeit mit hohem AGE-Gehalt nachgewiesen, außerdem konnten erhöhte Marker für oxidativen Stress und Entzündung verzeichnet werden [32]. Fleisch und Nahrungsmittel mit sehr hohem Fettanteil enthalten am meisten AGEs. Bei allen Nahrungsmitteln steigt der AGE-Gehalt vor allem bei trockener Erhitzung [33, 34].

Bei Rauchern wurden – unabhängig von Diabetes – erhöhte Serum-AGE-Spiegel festgestellt [35]. Beim Tabakrauchen werden sogenannte Glykotoxine in den Tabakrauch freigesetzt. Diese sind hochreaktiv und gelangen über die Lunge in die Blutbahn, wo sie die Bildung von AGEs beschleunigen [27, 36].

Auch wenn Oxidation nicht immer notwendig ist für die Genese von AGEs, so werden doch viele AGEs durch eine Kombination aus Oxidation und Glykierung gebildet. Die Entstehung von AGEs wird also auch durch oxidativen Stress getriggert [7, 37].

Neben einer vermehrten Bildung oder Zufuhr von AGEs kann auch eine verminderte Elimination zur Akkumulation führen. Da ein Großteil der Elimination über die Nieren vonstattengeht, kann eine Einschränkung der renalen Funktion, also der glomerulären Filtrationsrate, zu einer verminderten Ausscheidung und damit zu einer Akkumulation der AGEs führen [38, 39].

1.2.3 Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts

Es existieren mehrere Moleküle, die mit AGEs interagieren: Galectin-3 (AGE-R3), Oligosaccharyltransferase-48 (AGE-R1) oder Makrophagen scavenger Rezeptoren Typ I und II [28]. Der am besten untersuchte Rezeptor ist der sogenannte Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE), ein Multiligandrezeptor aus der Immunglobulin-Superfamilie der Zelloberflächenmoleküle. Er hat ein Molekulargewicht von 35 kDa und wurde auf Makrophagen, Zellen der glatten Muskulatur, Epithel-, Mesangial- und Endothelzellen beschrieben [27, 40-43]. Der RAGE kann allerdings nicht nur durch AGEs stimuliert werden, sondern auch von anderen Liganden, wie zum Beispiel von kalziumbindenden Proteinen der S100 Gruppe, High mobility group box 1 (HMGB1), β 2-Integrin Mac/CD11b oder Amyloid β -Peptid [28, 43, 44]. Interessanterweise wird er im Gegensatz zu anderen Rezeptoren wie dem LDL-Rezeptor über eine positive Feedbackschleife reguliert: Mit steigendem Liganden-Angebot wird er nicht weniger, sondern sogar vermehrt exprimiert [40, 45]. Ebenso verstärkt wird der RAGE unter oxidativem Stress exprimiert [46].

Ein weiterer Rezeptor, an den AGEs binden, ist der AGE-Rezeptor 1 (AGER1). Er führt zur Sequestrierung und somit zum Abbau von AGEs sowohl im Intra- als auch im Extrazellulärraum und wirkt so den oxidativen Effekten der AGEs entgegen [47]. Die verminderte Expression von AGER1 mit zunehmendem Alter und auch bei Diabetes könnte eine Ursache für die Akkumulation von AGEs darstellen [48].

1.2.4 Effekte der Advanced Glycation Endproducts

Die größte Auswirkung haben AGEs nach aktuellem Kenntnisstand auf das vaskuläre System. Zu finden sind sowohl die AGEs als auch ihr Rezeptor (RAGE) dabei vermehrt in Geweben, die von diabetischen Komplikationen betroffen sind, wie zum Beispiel den Nieren, Augen, und den Gefäßwänden [49]. AGEs können dort akkumulieren und noch für lange Zeit in den Geweben nachgewiesen werden [50]. Sie führen zu den makro- bzw. mikrovaskulären Schäden, die als Komplikationen von Diabetes mellitus gelten, wie kardiovaskuläre Erkrankungen oder diabetische

Retino-, Neuro- und Nephropathie [30, 50-52]. Das Schädigungspotenzial der AGEs begründet sich einerseits in der direkten Änderung der Proteinstrukturen durch die Glykierung selbst, andererseits durch die von ihnen gebildeten Quervernetzungen. AGEs finden sich oft in der Extrazellulärmatrix, wo sie als modifizierte Matrixproteine sowohl Matrix-Matrix- als auch Matrix-Zell-Interaktionen behindern [7].

Auf zellulärer Ebene greifen die AGEs jedoch hauptsächlich über Bindung an Rezeptoren ein: In Endothelzellen steigert die AGE-RAGE-Interaktion die Expression von Adhäsionsmolekülen und von proinflammatorischen, prothrombotischen Molekülen (wie zum Beispiel VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1). In Fibroblasten kommt es zu einer Steigerung der Kollagenproduktion, in glatten Muskelzellen beeinflusst die AGE-RAGE-Wechselwirkung die Migration, Proliferation und Expression von Matrix modifizierenden Molekülen. Außerdem werden in mononukleären Phagozyten Chemo- und Haptotaxis und die Expression von proinflammatorischen und prothrombotischen Molekülen gefördert und in Lymphozyten die Produktion von Interleukin 2 (IL2) gesteigert [27, 53].

Ferner steigert die Bindung von Liganden an den RAGE über eine Aktivierung der NADPH Oxidase die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und fördert so direkt oxidativen Stress [7]. Es wird vermutet, dass über diese AGE-induzierte, vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen in Mesangiumzellen der TGF- β -SMAD-Signalweg aktiviert wird. Dies wurde sowohl in Endothelzellen des proximalen Tubulus [54] als auch in Mesangiumzellen [55] nachgewiesen. Diese TGF- β -Aktivierung erfolgt vermutlich über eine AGE-induzierte vermehrte Angiotensin-II-Produktion und den Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor. So konnte zum einen die vermehrte Angiotensin-II-Bildung in AGE-exponierten Mesangiumzellen durch Antioxidantien vermindert werden, zum anderen konnte die AGE-induzierte SMAD2 Phosphorylierung und die TGF- β -induzierbare Promoter-Aktivität nicht nur mit der Gabe von TGF- β -Antikörpern sondern auch durch die Gabe von Candesartan vollständig verhindert werden [55]. AGEs bewirken also vermutlich über die Bindung an den RAGE eine Zunahme von Sauerstoffradikalen und dadurch über Angiotensin II und den Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor eine Aktivierung des TGF- β -SMAD-Signalwegs. Dieser Signalweg bewirkt sowohl eine mesangiale Zellhyper-

trophie als auch eine vermehrte Fibronectin Produktion und trägt so maßgeblich zur Entwicklung einer diabetischen Nephropathie bei (**Abbildung 6**) [55].

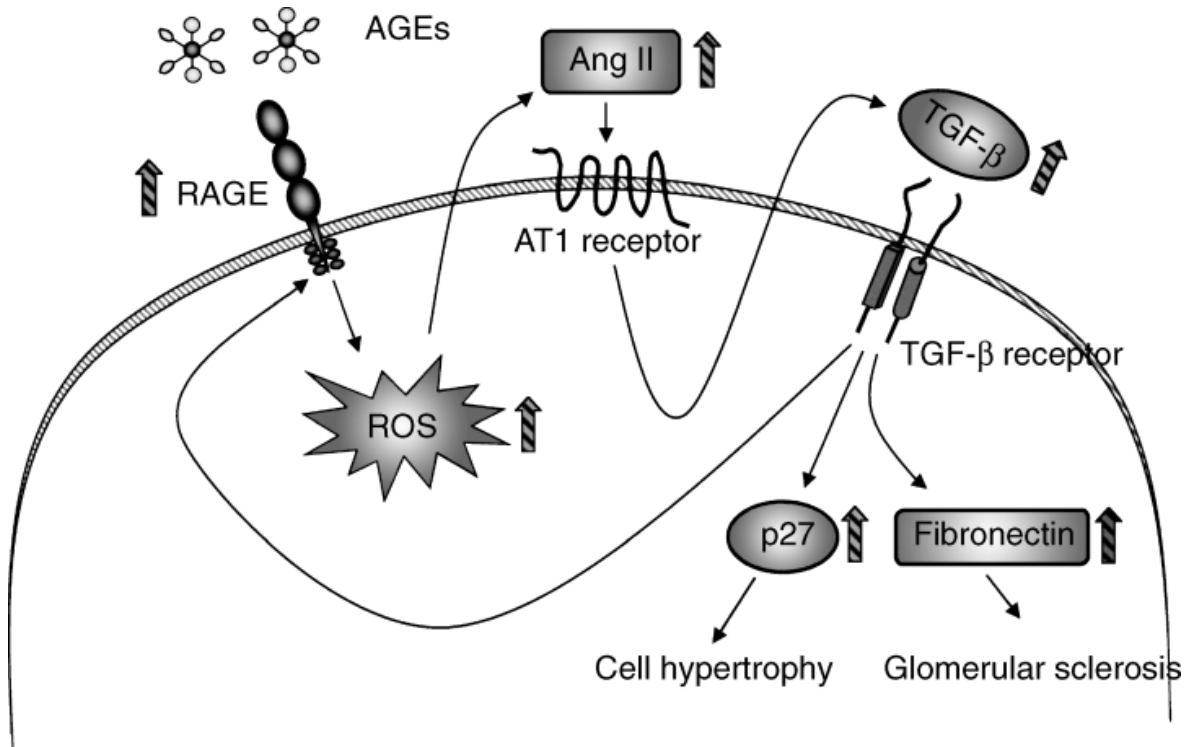


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung des TGF-β-SMAD Signalweges durch AGEs in Mesangiumzellen. Quelle: [55].

1.2.5 Messmethoden für Advanced Glycation Endproducts

Der Nachweis von AGEs kann über immunhistochemische Färbungen mit ELISA mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen verschiedene AGEs erfolgen. Eine sensitivere Methode ist die Hochleistungsflüssigchromatographie oder Gaschromatographie [56]. Meist werden AGEs mit diesen Verfahren im Serum bestimmt. Eine Alternative ist die gezielte Messung der AGEs in Probenmaterial aus Biopsien, da ein Großteil der AGEs in Geweben gebunden ist. [7]. Beide Verfahren sind jedoch relativ kostenintensiv und invasiv. Damit sind immer mögliche Risiken für den Patienten verbunden. Eine nicht-invasive Messmethode stellt die Fluoreszenzmessung der Haut dar. Hierbei macht man sich die spezifische Fluoreszenz der meisten AGEs zunutze:

Der Großteil der bisher identifizierten AGEs fluoresziert bei einer Exzitationswellenlänge um 370nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von etwa 440 nm. Das macht es möglich, eine für AGEs spezifische Fluoreszenz zu messen [7]. Man kann von einer signifikanten Korrelation zwischen den kutanen Autofluoreszenzwerten und den AGEs in der Haut ausgehen. Meerwaldt et al. maßen bei insgesamt 96 Probanden (46 Diabetes-Patienten und 46 Kontrollprobanden) die kutane Autofluoreszenz am Arm und verglichen sie anschließend mit kutanen Stanzbiopsien aus denselben Hautarealen. In den Gewebeproben wurde zum einen nach Zersetzung mit Pepsin die Fluoreszenz (Exzitation: 370nm, Emission: 440nm) gemessen und zum anderen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie die AGEs Pentosidin, Carboxymethyllysin (CML) und Carboxyethyllysin (CEL) quantifiziert. Die Fluoreszenz der Biopsie korrelierte signifikant mit Pentosidin, CML und CEL ($p < 0,01$). Auch die kutane Autofluoreszenz war signifikant mit der Fluoreszenz der Gewebeprobe ($r^2 = 0,62$), dem fluoreszierenden Pentosidin ($r^2 = 0,55$) und dem nichtfluoreszierenden CML ($r^2 = 0,55$) und CEL ($r^2 = 0,47$) assoziiert ($p < 0,01$) [57]. Die Messung der kutanen Autofluoreszenz stellt folglich eine repräsentative Messung der kutanen AGEs dar.

2. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, inwieweit die kutane Autofluoreszenz - als Maß für Advanced Glycation Endproducts - zum einen mit der prävalenten renalen Funktion und Albuminurie und zum anderen mit der Entwicklung renaler Funktionseinschränkungen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist.

3. Methoden

3.1 Studiendesign der DIACORE-Studie

Diese Arbeit ist Teil der DIACORE-Studie (DIAbetesCOhoRtE). DIACORE ist eine prospektive Kohortenstudie mit Biomaterialbank, die am Universitätsklinikum Regensburg (Abteilung für Nephrologie, Projektleiter: Prof. Dr. med. Carsten A. Bö-

ger) initiiert wurde, um Ursachen und Mechanismen der Entstehung und Progression von Komplikationen und Spätfolgen bei Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen [58]. Insgesamt konnten im Zeitraum von Februar 2010 bis August 2014 3000 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 in die DIACORE-Studie rekrutiert werden. 2491 davon wurden am Universitätsklinikum Regensburg, dem Hauptzentrum von DIACORE, rekrutiert, 509 Teilnehmer unter der Ägide von Prof. Dr. Bernhard Krämer von der Universitätsklinik Mannheim in einer Mannheimer Praxis für Diabetologie. Die teilnehmenden Patienten werden über einen Gesamtzeitraum von mindestens 10 Jahren beobachtet, das erste Follow-up begann im August 2013 und wurde in Regensburg im Dezember 2015 abgeschlossen. DIACORE wurde von den Ethikkommissionen aller beteiligten Institutionen geprüft und entspricht der Deklaration von Helsinki.

Nach Aufklärung und Einholung einer schriftlichen Einverständniserklärung werden die Teilnehmer zu Begleiterkrankungen, Risikofaktoren und Medikamenten befragt und körperlich untersucht, danach werden Urin- und Blutproben abgenommen. Diese werden in ein Zentrallabor zur Bestimmung eines umfangreichen Standardwerte-Laborprofils geschickt. Das allgemeine Studienprotokoll (Standardphänotypisierung) wird bei allen Patienten absolviert. In einer zufällig ausgewählten Untergruppe wird zusätzlich ein erweitertes Protokoll (Erweiterte Phänotypisierung) angewandt (siehe Gliederungspunkt 3.4). Sämtliche Untersuchungen und Befragungen werden ausschließlich von speziell geschultem Studienpersonal durchgeführt.

3.2 Patientenrekrutierung

3.2.1 Einschlusskriterien

Einschlusskriterien sind, neben prävalentem Diabetes mellitus Typ 2, eine nach eigenen Angaben kaukasische Abstammung und Volljährigkeit (Alter ≥ 18 Jahre). Das Vorliegen von Diabetes mellitus Typ 2 ist definiert durch den Bedarf einer blutzuckersenkenden Therapie, mindestens zwei Nüchternblutzuckermessungen mit einem Glukosewert von 126mg/dl oder mehr, oder durch einen Zwei-Stunden-

Glukose-Wert von über 200mg/dl bei einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT). Diese Diagnose-Kriterien werden durch Patientenbefragung oder durch Einsicht in die Krankenakten des Patienten geprüft.

3.2.2 Ausschlusskriterien

Patienten, die bei Aufnahme einer Nierenersatztherapie (Hämodialyse, Peritonealdialyse oder Nierentransplantation) unterliegen oder die in den letzten fünf Jahren (zwei Jahre bei Prostatakarzinomen) an einer aktiven malignen Erkrankung (ausgenommen Basalzellkarzinomen) gelitten haben oder noch leiden, werden nicht in die Studie aufgenommen. Außerdem ausgeschlossen werden Patienten mit einer Autoimmunerkrankung mit potenziellen Auswirkungen auf die Nierenfunktion, mit Hämochromatose, pankreoprivem Diabetes oder Diabetes mellitus Typ 1, akuten Infekten, Fieber, einer HIV-Infektion oder einer chronischen viralen Hepatitis, sowie Schwangere.

3.2.3 Durchführung der Rekrutierung

Um Patienten für die Studie zu akquirieren, wurden mehrere Strategien verfolgt: Die gesetzlichen Krankenversicherungen AOK, Barmer-GEK, DAK, TKK und IKK luden ihre Versicherten im Raum Regensburg (definiert durch einen Postleitzahlenbereich) mit Diabetes mellitus Typ 2 schriftlich zur Teilnahme ein. Des Weiteren wurden alle volljährigen an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten ohne bekannte Krebserkrankung, die in Regensburg oder Umgebung gemeldet sind, aus dem System der Inneren Medizin des Universitätsklinikums Regensburg gefiltert und schriftlich eingeladen, an der Studie teilzunehmen. Ferner wurde DIACORE von Hausärzten und niedergelassenen Diabetologen sowie von Krankenkassen unterstützt, die in Frage kommende Patienten mit der Bitte, sich im Studienzentrum zu melden, direkt ansprachen oder anschrrieben. Zusätzlich wurden Patienten durch Presseartikel in regionalen Zeitungen auf die Studie aufmerksam gemacht und Flyer im Uniklinikum Regensburg sowie in verschiedenen Arztpraxen ausgelegt.

3.3 Standardphänotypisierung

3.3.1 Körperliche Untersuchung

Am Anfang der Phänotypisierung steht die körperliche Untersuchung. Nach mindestens fünf Minuten ruhigen Sitzens werden Blutdruck und Puls über ein automatisches Blutdruckmessgerät (GE Dinamap Vital Signs Monitor, Model V100; CareScape, Deutschland) erfasst. Die Manschette wird am dominanten Arm auf Herzhöhe angelegt. Je nach Armumfang wird eine Standard-, bzw. eine Übergröße verwendet (23-33cm, bzw. 31-40cm). Drei Messungen werden jeweils im Abstand von zwei Minuten durchgeführt, systolischer und diastolischer Blutdruck werden bei der zweiten und dritten, der Puls nur bei der dritten Messung gespeichert. Größe, Gewicht und Körperrumfang werden mit leichter Kleidung und ohne Schuhe ermittelt. Das Gewicht wird von einer digitalen Waage in Kilogramm mit einer Dezimalstelle angezeigt, die Größe von einem Stadiometer in Zentimetern abgelesen. Taillen- und Hüftumfang werden horizontal mit einem 2,05m langen Maßband in ganzen Zentimetern gemessen. Der Taillenumfang ist definiert als der kleinste Umfang zwischen Rippenbogen und Iliakalkamm, der Hüftumfang als der größte Umfang unterhalb des Iliakalkamms, auf Höhe des Trochanter major und der Glutealmuskulatur. Das Tragen von Kleidung wird im Onlinefragebogen vermerkt und später gemäß Pischon et al. mit in die Berechnung der tatsächlichen Werte einbezogen: Bei leichter Kleidung ohne Schuhe wurden 1,5kg vom gemessenen Körpergewicht und 2cm des gemessenen Taillen- und Hüftumfangs abgezogen [59]. Der Quotient aus Körpergewicht (kg) und Größe (m) zum Quadrat ergibt den Body-Mass-Index (BMI; kg/m^2). Der Taillen-Hüft-Quotient (Waist-Hip-Ratio, WHR) wird als Quotient aus Taillenumfang und Hüftumfang definiert.

3.3.2 Befragung

Nach der körperlichen Untersuchung und der Blutentnahme erhebt die Studienschwester nach einem standardisierten Onlinefragebogen (electronic Case Report Form, eCRF) eine ausführliche Anamnese. Diese beinhaltet Auskünfte über ethnische Abstammung, Krankenversicherungsstatus, Geburtsgewicht (soweit be-

kannt), Teilnahme an Disease Management Programmen der Krankenkassen, körperliche Aktivität, Nikotin- und Alkoholkonsum, nephrologische und urologische Krankengeschichte und Familienanamnese, sowie die Erfassung von kardiovaskulären Risikofaktoren und Komplikationen, Medikationen, Krankenhausaufenthalten und eventuell in der Vergangenheit aufgetretenen Krebsleiden. Ferner wird dokumentiert, wie der Patient auf die Studie aufmerksam wurde.

3.3.3 Biosampling

Nach mindestens 15 Minuten in ruhiger Sitzhaltung werden Vollblutproben unter leichter venöser Stauung mit einer 21G Butterfly-Nadel in EDTA-, Natriumfluorid-, Serumgel- (alle Sarstedt AG, Deutschland) entnommen. Am Schluss der Untersuchung wird der Patient gebeten, eine Mittelstrahl-Urinprobe in einen sterilen 100ml-Becher abzugeben. In **Tabelle 2** findet sich ein Überblick über die Bioproben und die darin untersuchten Parameter.

Biomaterial	Parameter
Serum	Kreatinin, Cystatin C, Harnstoff, Calcium, Phosphat, hsCRP, Albumin, Cholesterin, Triglyceride, LDL, HDL, Harnsäure, Insulin
Vollblut	Kleines Blutbild, HbA1c, Glukose
Urin	Albumin, Kreatinin, Schnellteststreifen semiquantitativ Protein, Erythrozyten, Leukozyten, Nitrit

Tab. 2: Verwendung der Bioproben. Quelle: [58].

Blut- und Urinproben werden wie berichtet in einem Zentrallabor analysiert und die Ergebnisse automatisiert in den eCRF übertragen [58]. Ein schriftlicher Bericht mit den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und des Standardlabors - Laborwerte werden angegeben mit an Alter und Geschlecht angepassten Referenzwerten - wird den Patienten nachträglich per Post zugesandt.

3.3.4 Validierung

Um die von den Patienten gemachten Angaben zu validieren, werden nach jeder Erhebung die entsprechenden Befunde von Fach-, Hausärzten oder Kliniken angefordert. Auf Basis dieser Befunde werden die Patientenangaben von Ärzten der Studie validiert. Sollte ein Befund nicht validierbar sein, wird dies im eCRF vermerkt.

3.4 Messung der kutanen Autofluoreszenz

Zusätzlich zum allgemeinen Studienprotokoll wurde für diese Arbeit bei 789 Studienteilnehmern mit Hilfe des AGE-Readers (Diagnoptics, Groningen, NL) die kutane Autofluoreszenz als Maß für die AGEs gemessen. Der Einsatz des AGE-Readers wurde im April 2012 in Regensburg begonnen, die Auswahl der Patienten erfolgte per Zufall: das Gerät stand in einem von drei Untersuchungszimmern. Alle Patienten, die in diesem Zimmer untersucht wurden, erhielten eine AGE-Messung. Die Zuweisung zu einem der drei Untersuchungszimmer unterlag keinen Selektionskriterien, sondern erfolgte je nach Freiwerden eines Zimmers.

Viele AGEs haben eine charakteristische Fluoreszenz (Gliederungspunkt **1.2.5**). Der AGE-Reader bestrahlt das untersuchte Hautareal mit einer speziellen Lichtquelle (300 – 420nm), fluoreszierende Gruppen im Hautgewebe werden gereizt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge (420 – 600nm), das vom AGE-Reader durch ein Spektrometer und Photodioden detektiert wird. Die Fluoreszenz des Spektrums mit der Wellenlänge 420-600nm stammt überwiegend von den AGEs, so kann von der gemessenen Autofluoreszenz der Haut auf die dort abgelagerten AGEs geschlossen werden [57]. Der Wert der kutanen Autofluoreszenz wird in arbiträren Einheiten wiedergegeben und errechnet sich als Quotient aus der totalen Emissionsintensität (420 – 600nm) und der totalen Exzitationsintensität (300 – 420nm) [57, 60]. Für diese Studie wurde die Autofluoreszenz dreimal unmittelbar hintereinander auf einer 1cm² großen Hautfläche an der Beugeseite des Unterarms mit dem AGE-Reader bestimmt. Aus diesen drei Messwerten wurde jeweils ein Mittelwert gebildet, der als Basis für die weiteren Berechnungen diente. Es wurde bei der Messung darauf geachtet, Hautareale zu verwenden, die frei von Tattoos oder Kosmetika sind und möglichst wenige Sommersprossen oder Naevi

aufweisen. Die Patienten wurden bei der Terminvereinbarung darum gebeten, am Tag der Untersuchung keine Kosmetika oder andere Externa, wie z.B. Sonnenmilch an den Armen zu verwenden. Laut Hersteller ist eine verlässliche Auswertung der Autofluoreszenz nur bei helleren Hauttypen möglich (Fitzpatrick Klassifikation 1 - 4), nicht aber bei dunkelhäutigen Patienten (Fitzpatrick Klassifikation 5 und 6). Allerdings schließt diese Studie ausschließlich Patienten kaukasischer Abstammung ein. Alle Patienten waren einem Hauttyp zwischen 1 und 4 nach Fitzpatrick zuzuordnen.

UV-Strahlung, wie sie auch im AGE-Reader zur Anwendung kommt, birgt das Risiko einer aktinischen Schädigung der Haut. Für die beim AGE-Reader verwendete Bestrahlungsintensität und Entfernung der Lichtquelle zur Haut (77mm) beträgt die maximal tolerierbare Expositionsdauer 10000s. Bei der Anwendung des AGE-Readers kommt es zu einer Exposition von weniger als 10s. Selbst im Falle eines Software-Fehlers kann die maximale Expositionszeit aufgrund eines speziellen Timers 50s nicht überschreiten. Von dem Risiko einer aktinischen Schädigung durch den AGE-Reader ist also nicht auszugehen [61]. Mit dem AGE-Reader wurden pro Patient drei Messungen durchgeführt, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Einzelwerte, die um mehr als 1,0 von dem Mittelwert der anderen beiden näher zusammenliegenden Einzelmessungen abwichen, wurden als Ausreißer von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Insgesamt wurden 12 Einzelmessungen von 12 Patienten auf diese Weise eliminiert. Der korrigierte Mittelwert wurde aus den beiden verbleibenden Einzelmessungen gebildet (**Tabelle 3**).

Gelöschte Einzelmessung	Ursprünglicher Mittelwert	Korrigierter Mittelwert
3,59	2,83	2,45
4,53	2,83	1,98
3,68	2,87	2,46
9,33	4,51	2,10
7,80	4,54	2,91
7,56	4,38	2,80
0,24	1,73	2,48
3,75	2,65	2,09
5,22	4,00	3,39
4,93	3,47	2,73
5,12	3,28	2,36
2,90	2,16	1,79

Tab. 3: Aus Plausibilitätsgründen gelöschte Einzelmesswerte der kutanen Autofluoreszenz und die daraus entstandene Veränderung der verwendeten Mittelwerte.

3.5 Definition der Endpunkte

Klinische Endpunkte werden bei der Eingangsuntersuchung (Querschnittanalyse) sowie bei den Folgeuntersuchungen (Längsschnittanalyse) aufgenommen. Die renalen Endpunkte werden direkt oder indirekt durch Laborwerte definiert: Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird mittels der CKD-EPI-Formel geschätzt (eGFR, [ml/min/1,73m²]) [62]. Die Urin-Albumin-Kreatinin-Ratio (UACR) errechnet sich folgendermaßen: $\frac{\text{Urinalbumin}}{(\text{Urinkreatinin}/100)}$, wobei Urinalbumin in mg/l und Urinkreatinin mg/dl angegeben werden. Bei Urin-Albumin-Werten < 3 mg/l gilt die Formel: $\frac{3\text{mg/l}}{(\text{Urinkreatinin}/100)}$. Zur Erzielung einer Normalverteilung wird die UACR logarithmiert (lnUACR). Eine UACR ≥ 30 definiert das Vorliegen einer Albuminurie. CKD wird definiert durch eine eGFR < 60 ml/min/1,73m². Die Abnahme der eGFR pro Jahr ergibt sich aus der Differenz der eGFR-Werte der Baseline-Untersuchung und der ersten Follow-up-Untersuchung geteilt durch die Anzahl der Dauer in Jah-

ren, die zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten liegen. Es ergibt sich also ein positiver Wert bei Abnahme der eGFR. Diese jährliche eGFR-Abnahme wird wiederum in zwei dichotome Variablen aufgeteilt: Rapid5 unterscheidet Patienten mit einer Abnahme der eGFR von mindestens 5 ml/min/1,73m² pro Jahr und Patienten, deren eGFR weniger stark oder gar nicht abgenommen hat. Rapid3 teilt das Patientenkollektiv dementsprechend in eine Gruppe mit einer eGFR-Abnahme von > 3ml/min/1,73m² pro Jahr und eine, deren eGFR maximal um 3ml/min/1,73m² pro Jahr gesunken ist. Mit der Variablen CKDi25 wird die Patientengruppe definiert, die im Zeitraum zwischen der Baseline-Untersuchung und dem ersten Follow-up eine CKD neu entwickelt und dabei eine Verschlechterung der eGFR um mindestens 25% erlitten hat. Die dichotome Variable Neuauftretene Albuminurie beschreibt die Patienten, bei denen bei Visite 2 (Follow-up) Albuminurie nachgewiesen werden konnte, bei der Baseline-Untersuchung jedoch noch nicht.

3.6 Definition der Kovariaten

Laut Jager et al. [63] muss eine Variable drei Eigenschaften erfüllen, um als Kovariate („confounder“) zu gelten: Sie muss einen Effekt auf die Zielvariable haben, sie muss mit der Expositionsvariable (also in diesem Fall mit der kutanen Autofluoreszenz) assoziiert sein und sie darf kein Effekt der Expositionsvariable sein. Entsprechend wurden in den multivariaten Analysen folgende Baselinevariablen als Kovariaten eingesetzt: Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, HbA1c, Taillen-Hüft-Quotient, und aktueller Nikotinabusus. Bei den longitudinalen Analysen wurde zusätzlich die Baseline-eGFR als Kovariate eingesetzt.

Zahlreiche andere Studien betrachten die kutane Autofluoreszenz nicht als Expositionsvariable, sondern als Outcome. Mehrere dieser Arbeiten zeigen in multivariaten Regressionsanalysen einen signifikanten Zusammenhang der kutanen Autofluoreszenz unter anderem mit Alter, Geschlecht, Diabetesdauer, Nikotinabusus, HbA1c und eGFR [38, 64-67]. Diese Ergebnisse untermauern die in dieser Arbeit getroffene Auswahl der Confounder.

3.7 Statistische Methodik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms JMP 12 der Firma SAS Institute. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Wo nicht anders ausgewiesen, werden Mittelwerte immer mit Standardabweichung (SD) angegeben. In Korrelationsanalysen zwischen der kutanen Autofluoreszenz und den renalen Endpunkten (Definition siehe 3.5) wird zunächst für jeden Endpunkt die univariate Assoziation und im Anschluss die multivariate Assoziation mit der kutanen Autofluoreszenz unter Adjustierung für die Kovariaten (Gliederungspunkt 3.6) durchgeführt. Als statistisches Modell für die Querschnittsanalyse wurde bei kontinuierlichen Zielvariablen die lineare multivariate Regression gewählt, bei dichotomen Zielvariablen die binäre logistische Regression. In den longitudinalen Analysen wurden Hazard Ratios (mittels Cox Regressionsanalyse) für dichotome Zielvariablen und eine lineare multivariate Regression bei der kontinuierlichen Variable der jährlichen eGFR-Abnahme berechnet. Als Zeitvariable bei der Berechnung der Hazard Ratios wurde die Dauer zwischen Baseline- und erster Follow-up-Untersuchung verwendet.

Zum Beleg ausreichender Patientenzahlen zum Erreichen des Signifikanzniveaus wurden zudem für die Querschnittsanalysen Poweranalysen a posteriori mit dem Programm G*Power durchgeführt. Für die Poweranalyse wurde aus rechnerischen Gründen vereinfachend als Patientenzahl $n=700$ gewählt. Berechnet wurde die Power für das jeweilige β bei linearen multivariaten Regressionen bzw. für die jeweilige Odds Ratio bei binären logistischen Regressionen. Zur rechnerischen Vereinfachung wurden die Werte der Odds Ratio und von β ebenfalls gerundet. Als Schwellenwert für die Power wurde 80% gewählt.

Variable	eGFR	UACR	Albuminurie	CKD	Jährliche Abnahme der GFR
Power	0,77	0,76	0,97	0,94	0,31
Verwendetes β	4	0,3	-	-	0,5
Verwendete Odds Ratio	-	-	1,4	1,4	-

Tab. 4: Post hoc Poweranalyse der Querschnittsanalysen für das jeweilige β bei linearen multivariaten Regressionen bzw. für die jeweilige Odds Ratio bei binären logistischen Regressionen. Patientenzahl n=700. Power > 0,80 wurden hervorgehoben.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

In 789 DIACORE-Studienteilnehmern wurde in der Baseline-Visite die kutane Autofluoreszenz mit dem AGE-Reader gemessen (**Tabelle 5**). 61,22% der Probanden sind männlich, das Durchschnittsalter liegt bei 65,76 (\pm 9,16) Jahren. Bei einer mittleren Diabetesdauer von 10,03 (\pm 8,36) Jahren werden 26,74% der Patienten mit einer Insulintherapie behandelt, der durchschnittliche HbA1c-Wert liegt bei 6,63%. Auch die weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren sind statistisch in diesem Kollektiv gut eingestellt (vgl. Durchschnittswerte Tabelle 5: RR 138,06/73,95mmHg, LDL 115mg/dl, HDL 51mg/dl, Cholesterin 200mg/dl, Triglyceride 143,76mg/dl). 11,03% der Probanden rauchen aktiv. Die Charakteristika ähneln jenen des Gesamtkollektiv der DIACORE Studie (n=3000) (persönliche Kommunikation Prof. Carsten Böger).

	Patientenkollektiv (n=789)
Kutane Autofluoreszenz	2,38 ± 0,5
Männliches Geschlecht, n (%)	483 (61,22%)
Alter, Jahre	65,76 ± 9,16
Diabetesdauer, Jahre	10,03 ± 8,36
Insulintherapie, n (%)	211 (26,74%)
Blutzucker, mg/dl *	125 (104-149,82)
HbA1c, % *	6,63 (6,18-7,18)
LDL, mg/dl *	115 (91,34-143,74)
HDL, mg/dl *	51 (42-61)
Triglyceride, mg/dl *	143,76 (102-207)
Cholesterin, mg/dl *	200 (173-234,75)
BMI, kg/m ²	31,38 ± 5,68
WHR	0,96 ± 0,08
RR Systole, mmHg	138,06 ± 17,85
RR Diastole, mmHg	73,95 ± 10,12
eGFR, ml/min/1,73m ² *	79,44 (63,56-91,8)
UACR, mg/g *	10,56 (4,67-32,86)
Albuminurie, n (%)	201 (25,48%)
CKD, n (%)	160 (20,28%)
Aktueller Nikotinabusus, n (%)	87 (11,03%)
Zurückliegender Nikotinabusus, n (%)	363 (46,01%)
Kein Nikotinabusus, n (%)	321 (40,68%)

Tab. 5: Patientencharakteristika bei der Baseline Visite. Mittelwerte ± SD, Anzahl (%), *: Median (25% IQR).

Die Patientencharakteristika unterscheiden sich zwischen Männern und Frauen geringfügig (**Tabelle 6**): Die Männer leiden im Mittel 1 Jahr länger an Diabetes. Die weiblichen Probanden weisen gegenüber den Männern höhere LDL-, HDL- und Gesamtcholesterinwerte sowie einen höheren BMI auf, während WHR und UACR bei den Frauen deutlich niedriger ausfällt als bei den männlichen Teilnehmern. Die eGFR zeigt sich bei Frauen und Männern vergleichbar.

	Männer (n=483)	Frauen (n=306)	p
Kutane Autofluoreszenz	2,41 ± 0,50	2,32 ± 0,49	0,07
Alter, Jahre	65,75 ± 8,92	65,78 ± 9,55	0,98
Diabetesdauer, Jahre	10,52 ± 8,85	9,26 ± 7,47	0,03
Insulintherapie, n (%)	129 (26,71%)	82 (26,80%)	0,98
Blutzucker, mg/dl *	129 (107,46-149,58)	117,91 (102-150,5)	0,14
HbA1c, % *	6,63 (6,18-7,21)	6,63 (6,08-7,02)	0,79
LDL, mg/dl *	109,21 (88,71-137)	125 (100-151,25)	<0,01
HDL, mg/dl *	48 (40-57)	57 (48-69,82)	<0,01
Triglyceride, mg/dl *	140,5 (101,75-208,25)	149,5 (102-206,12)	0,34
Cholesterin, mg/dl *	189 (164,99-223)	216,42 (188,77-247,25)	<0,01
BMI, kg/m ²	31,00 ± 5,45	31,99 ± 5,97	0,02
WHR	0,999 ± 0,06	0,90 ± 0,07	<0,01
RR Systole, mmHg	138,78 ± 18,10	136,94 ± 17,42	0,16
RR Diastole, mmHg	75,57 ± 10,36	71,41 ± 9,19	<0,01
eGFR, ml/min/1,73m ² *	78,99 (63,2-91,79)	81,03 (64,1-92,28)	0,52
UACR *	11,99 (4,14 – 46,12)	9,37 (5,11-22,09)	<0,01
Albuminurie, n (%)	150 (31,06%)	51 (16,67%)	<0,01
CKD, n (%)	100 (20,70%)	60 (19,61%)	0,70
Aktueller Nikotinabusus, n (%)	55 (11,39%)	32 (10,46%)	0,68
Zurückliegender Nikotinabusus, n (%)	273 (56,52%)	90 (29,41%)	<0,01
Kein Nikotinabusus, n (%)	143 (29,61%)	178 (58,17%)	<0,01

Tab. 6: Patientencharakteristika im Vergleich zwischen den Geschlechtern. Mittelwerte ± SD, Anzahl (%), *: Median (25% IQR). p berechnet mit t-Test bei kontinuierlichen Variablen bzw. mit Chi² bei dichotomen Variablen.

Die mittlere kutane Autofluoreszenz liegt im Gesamtkollektiv bei 2,38 (± 0,5) (**Abbildung 7**). Im Vergleich zu den Frauen (2,32 ± 0,49) zeigen die Männer (2,41 ± 0,50) einen um 0,09 nicht signifikant höheren Autofluoreszenzwert (**Tabelle 6, Abbildungen 8, 9**).

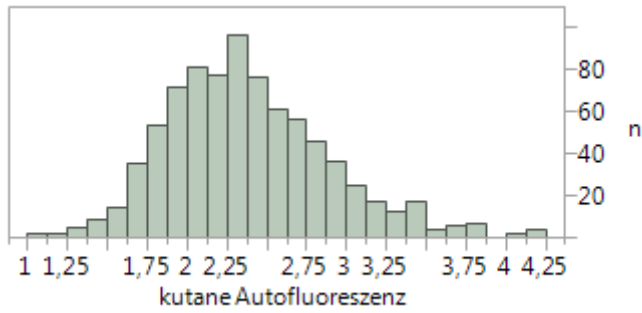


Abb. 7: Verteilung der kutanen Autofluoreszenz-Werte im Patientenkollektiv.

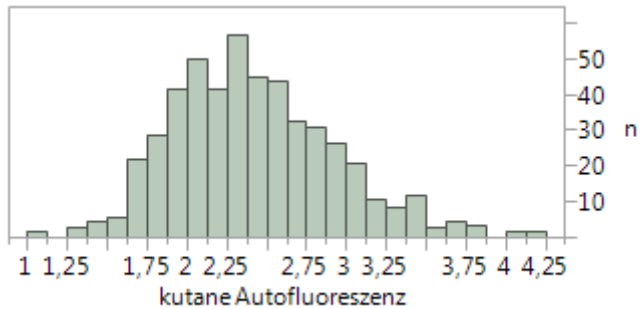


Abb. 8: Verteilung der kutanen Autofluoreszenz-Werte bei den männlichen Probanden.

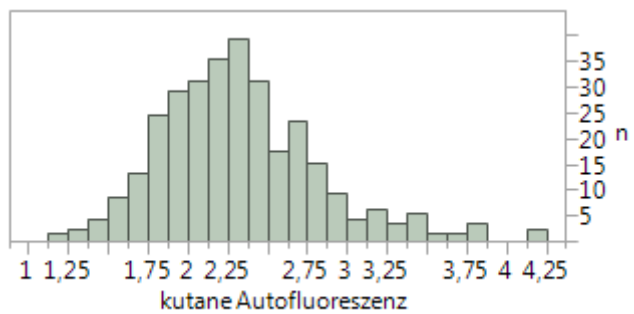


Abb. 9: Verteilung der kutanen Autofluoreszenz-Werte bei den weiblichen Probanden.

Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen der Baseline-Untersuchung und dem ersten Follow-up beträgt 2,54 (\pm 0,37) Jahre. Von 789 Studienteilnehmern bei der Baseline-Untersuchung konnten 718 erfolgreich in die Follow-up-Untersuchung einbezogen werden. Das entspricht einem „Lost-to-Follow-up“ von 8,99%. **Tabelle 7** zeigt die bis zur Follow-up-Untersuchung aufgetretenen renalen Ereignisse.

	Follow-up (2. Visite)
n	718
Zeit bis zum Follow-up, Jahre	2,54 ± 0,37
Abnahme der eGFR, ml/min/1.73m ² pro Jahr	0,99 ± 4,53
Rapid5, n (%)	85 (11,84%)
Rapid3, n (%)	157 (21,87%)
CKDi25, n (%)	21 (2,92%)
Neuaufgetretene Albuminurie, n (%)	44 (6,13%)

Tab. 7: Renale Endpunkte bei der 1. Follow-up-Untersuchung.

4.2. Kutane Autofluoreszenz und renale Endpunkte: Querschnittsanalyse

4.2.1 eGFR

In der univariaten Analyse ist die kutane Autofluoreszenz signifikant mit der eGFR bei der Baseline-Visite assoziiert ($\beta = -10,45$; $p < 0,01$; **Abbildung 10**).

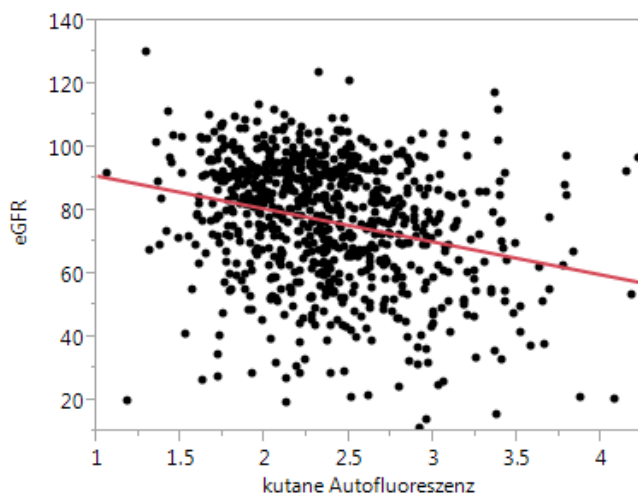


Abb. 10: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der eGFR nach der CKD-EPI-Definition. $p < 0,01$; β : -10,45.

In der multivariaten Analyse sind kutane Autofluoreszenz, Alter, Diabetesdauer und HbA1c signifikant mit der eGFR assoziiert (**Tabelle 8**).

Durch diese Faktoren werden 32% der Variabilität der eGFR erklärt ($r^2 = 0,32$).

Variablen	β	p
Kutane Autofluoreszenz	-3,68	<0,01
Männliches Geschlecht	0,53	0,48
Alter	-1,07	<0,01
Diabetesdauer	-0,18	0,02
HbA1c (%)	1,56	<0,01
WHR	-15,79	0,08
Aktueller Nikotinabusus	0,96	0,33

Tab. 8: Multivariate lineare Regressionsanalyse mit der Zielvariablen eGFR. Kovariaten: männliches Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, HbA1c, WHR, aktueller Nikotinabusus. $r^2= 0,32$. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.2.2 UACR

Die logarithmierte UACR korreliert signifikant mit der kutanen Autofluoreszenz: Für jede Einheit, um die die Autofluoreszenz zunimmt, steigt die lnUACR um 0,55 (**Abbildung 11**, $p<0.01$).

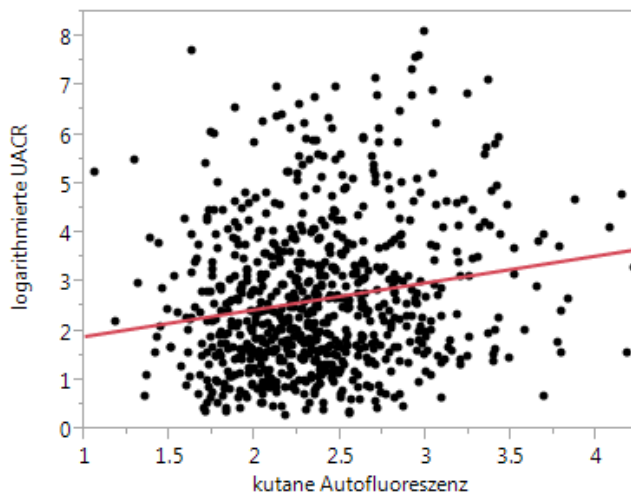


Abb. 11: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der logarithmierten UACR. $p<0,01$; $\beta: 0,55$.

In der multivariaten Analyse korrelieren kutane Autofluoreszenz, Diabetesdauer, HbA1c, WHR und aktueller Nikotinabusus signifikant mit der UACR ($r^2=0,10$; **Tabelle 9**).

Variablen	β	p
Kutane Autofluoreszenz	0,29	0,01
Männliches Geschlecht	-0,04	0,56
Alter	0,01	0,07
Diabetesdauer	0,02	<0,01
HbA1c (%)	0,16	<0,01
WHR	2,93	<0,01
Aktueller Nikotinabusus	0,26	<0,01

Tab. 9: Lineare multivariate Regression mit der Zielvariablen lnUACR. $r^2= 0,10$. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.2.3 Albuminurie

Die mittlere kutane Autofluoreszenz der 201 Patienten mit Albuminurie ist signifikant höher als bei den 533 Patienten ohne Albuminurie (**Abbildung 12**).

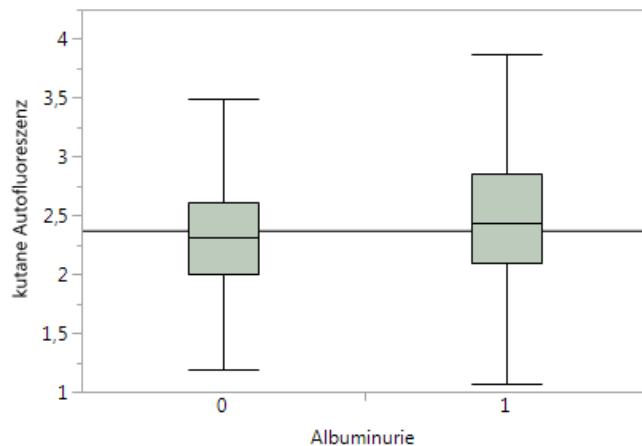


Abb. 12: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit Albuminurie. $p < 0,01$.

In der multivariaten Analyse ergab die logistische Regression eine signifikante Assoziation von kutaner Autofluoreszenz, Diabetesdauer, HbA1c und WHR mit dem Vorliegen einer Albuminurie (AUC=0,69; **Tabelle 10**).

Variablen	β	Odds Ratio	p
Kutane Autofluoreszenz	0,39	1,47	0,04
Männliches Geschlecht	0,17	1,19	0,13
Alter	0,01	1,01	0,55
Diabetesdauer	0,02	1,02	0,04
HbA1c (%)	0,28	1,33	<0,01
WHR	5,1	163,56	<0,01
Aktueller Nikotinabusus	0,13	1,14	0,34

Tab. 10: Binäre logistische Regression mit der Zielvariablen Albuminurie. AUC= 0,69. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.2.4 CKD

Die kutanen Autofluoreszenz liegt bei Patienten mit prävalenter CKD signifikant höher als bei Patienten ohne CKD ($p < 0,01$; **Abbildung 13**).

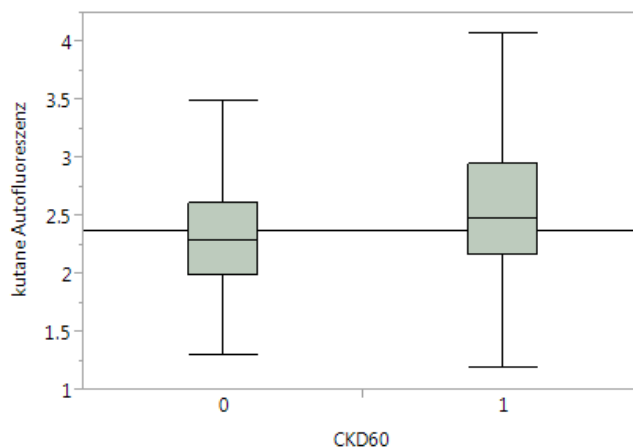


Abb. 13: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit CKD. $p < 0,01$.

Die kutane Autofluoreszenz ist wie Geschlecht, Diabetesdauer, HbA1c und Nikotinabusus nicht signifikant mit prävalenter CKD assoziiert. Die Wahrscheinlichkeit, an CKD zu leiden, wird signifikant von Alter und WHR mitbestimmt (AUC=0,78, **Tabelle 11**).

Variablen	β	Odds Ratio	p
Kutane Autofluoreszenz	0,39	1,48	0,06
Männliches Geschlecht	-0,2	0,82	0,11
Alter	0,12	1,13	<0,01
Diabetesdauer	0,02	1,02	0,05
HbA1c (%)	-0,17	0,84	0,12
WHR	4,53	92,88	<0,01
Aktueller Nikotinabusus	-0,1	0,91	0,62

Tab. 11: Binäre logistische Regression mit der Zielvariablen CKD. AUC=0,78. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.3 Kutane Autofluoreszenz und renale Endpunkte: Longitudinale Analyse

4.3.1 Abnahme der eGFR pro Jahr

Die kutane Autofluoreszenz ist nicht mit der jährlichen Abnahme der eGFR assoziiert ($p=0,18$; **Abbildung 14**).

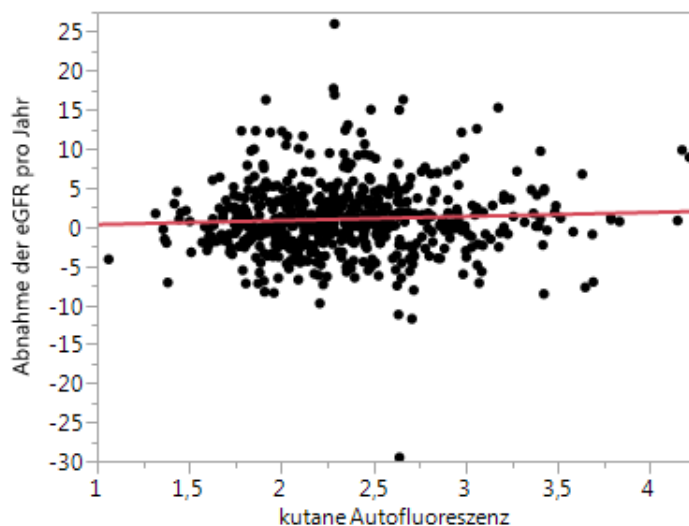


Abb. 14: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der jährlichen Abnahme der eGFR im Zeitraum zwischen Baseline- und Follow-up-Untersuchung. $p=0,18$; $\beta=0,52$.

Die multivariate logistische Regression zeigt einen signifikanten Zusammenhang von Alter und Ausgangs-eGFR mit einer jährlichen Abnahme der eGFR ($r^2=0,03$). Weder die kutane Autofluoreszenz noch Geschlecht, Diabetesdauer, HbA1c, WHR

oder aktueller Nikotinabusus waren signifikant mit der Zielvariablen assoziiert (**Tabelle 12**).

Variablen	β	p
Kutane Autofluoreszenz	0,47	0,27
Männliches Geschlecht	-0,19	0,42
Alter	0,06	0,01
Diabetesdauer	0,01	0,75
HbA1c (%)	0,33	0,05
WHR	0,58	0,84
Aktueller Nikotinabusus	0,26	0,43
eGFR (Baseline)	0,05	<0,01

Tab. 12: Lineare multivariate Regression mit der Zielvariablen Abnahme der eGFR pro Jahr. $r^2= 0,03$. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.3.2 Rapid5

In Patienten mit oder ohne Rapid5 zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der kutanen Autofluoreszenz ($p=0,13$, **Abbildung 15**).

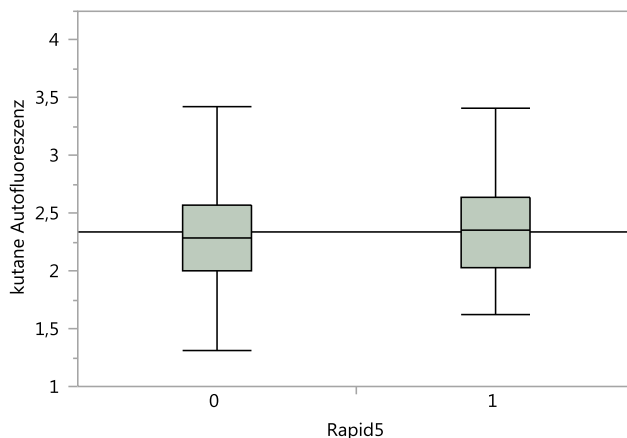


Abb. 15: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der Rapid5-Variablen. $p=0,13$.

Das Risiko, einen eGFR-Abfall von mindestens 5 ml/min/1.73m^2 pro Jahr zu erleiden, wird in dem untersuchten Modell vom Alter und der eGFR bei Baseline signi-

signifikant beeinflusst. Der Effekt der kutanen Autofluoreszenz auf die Variable Rapid5 ist nicht signifikant, ebenso der von Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, WHR und Raucherstatus (**Tabelle 13**).

Variablen	β	Hazard Ratio	CI (95%)	p
Kutane Autofluoreszenz	0,17	1,18	0,72 - 1,95	0,51
Männliches Geschlecht	-0,13	0,87	0,67 - 1,14	0,33
Alter	0,05	1,05	1,01 - 1,08	0,01
Diabetesdauer	-0,002	1,00	0,97 - 1,03	0,90
HbA1c (%)	0,06	1,06	0,89 - 1,27	0,49
WHR	1,02	2,77	0,08 - 93,51	0,57
Aktueller Nikotinabusus	0,10	1,10	0,76 - 1,59	0,61
eGFR (Baseline)	0,02	1,02	1,00 - 1,03	0,02

Tab. 13: Multivariate Cox-Regression für Rapid 5. Zeitvariable: Dauer von der Baseline- bis zur Follow-up-Untersuchung; Zielvariable: Rapid5. CI = Konfidenzintervall. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.3.3 Rapid3

In Patienten mit oder ohne Rapid3 zeigt sich kein Unterschied in der kutanen Autofluoreszenz ($p=0,13$, **Abbildung 16**).

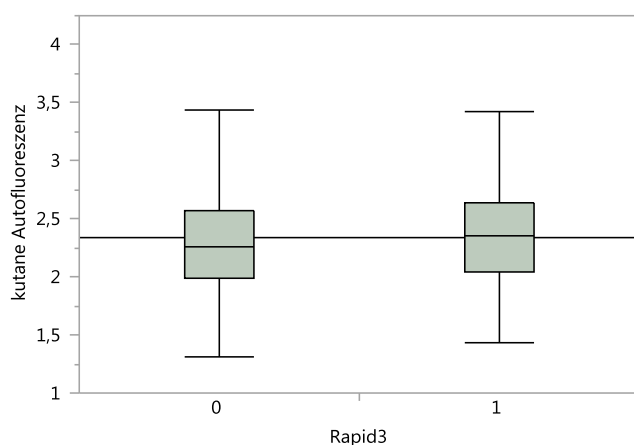


Abb. 16: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der Rapid3-Variablen. $p=0,08$.

Im multivariaten Modell sind keine der Variablen signifikant mit Rapid3 assoziiert (**Tabelle 14**).

Variablen	β	Hazard Ratio	CI (95%)	p
Kutane Autofluoreszenz	0,03	1,03	0,71 - 1,49	0,88
Männliches Geschlecht	-0,05	0,95	0,78 - 1,16	0,6
Alter	0,02	1,02	1,00 - 1,04	0,11
Diabetesdauer	0,01	1,01	0,99 - 1,03	0,31
HbA1c (%)	0,05	1,05	0,91 - 1,19	0,50
WHR	0,03	1,03	0,07 - 14,35	0,99
Aktueller Nikotinabusus	0,15	1,17	0,88 - 1,51	0,26
eGFR (Baseline)	<0,01	1,00	0,99 - 1,02	0,45

Tab. 14: Multivariate Cox-Regression für Rapid 5. Zeitvariable: Dauer von der Baseline- bis zur Follow-up-Untersuchung; Zielvariable: Rapid3. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.3.4 CKDi25

Die kutane Autofluoreszenz bei Baseline ist in Patienten, die bei der 1. Follow-up Visite den Phänotypen CKDi25 entwickeln, statistisch signifikant höher als in Patienten, die diesen Phänotypen nicht entwickeln ($p=0,04$; **Abbildung 17**).

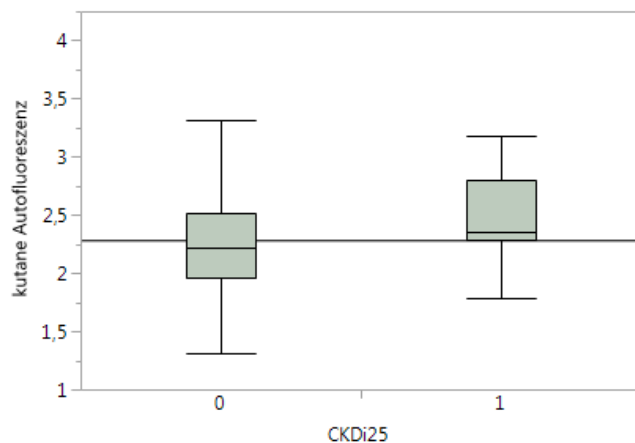


Abb. 17: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der CKDi25-Variablen. $p=0,04$.

Ausschließlich das Patientenalter korreliert in der multivariaten Analyse mit CKDi25 ($p=0,01$). Kutane Autofluoreszenz, Geschlecht, Diabetesdauer, HbA1c, WHR, Nikotinabusus und Baseline-eGFR sind nicht signifikant mit CKDi25 assoziiert (**Tabelle 15**).

Variablen	β	Hazard Ratio	CI (95%)	p
Kutane Autofluoreszenz	0,61	1,84	0,69 - 4,90	0,22
Männliches Geschlecht	-0,18	0,84	0,48 - 1,46	0,53
Alter	0,09	1,09	1,02 - 1,16	0,01
Diabetesdauer	0,01	1,01	0,95 - 1,06	0,83
HbA1c (%)	0,03	1,03	0,70 - 1,50	0,89
WHR	0,29	1,34	<0,01 - 2241,81	0,94
Aktueller Nikotinabusus	-0,09	0,91	0,41 - 2,02	0,82
eGFR (Baseline)	-0,005	1,00	0,95 - 1,04	0,83

Tab. 15: Multivariate Cox-Regression für CKDi25. Zeitvariable: Dauer von der Baseline- bis zur Follow-up-Untersuchung; Zielvariable: CKDi25. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

4.3.5 Neuaufgetretene Albuminurie

Die kutane Autofluoreszenz bei der Baseline-Visite ist in Patienten, die bei der 1. Follow-up Visite eine neue Albuminurie entwickeln, nicht signifikant höher als in Patienten, die keine Albuminurie entwickeln ($p=0,10$; **Abbildung 18**).

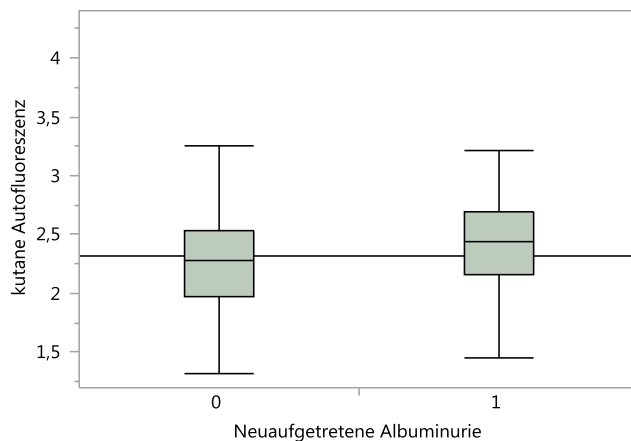


Abb. 18: Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit neuaufgetretener Albuminurie. $p=0,10$.

Weder die kutane Autofluoreszenz noch eine der Kovariaten ist in dem multivariaten Modell signifikant mit dem Risiko assoziiert, eine Albuminurie neu zu entwickeln (**Tabelle 16**).

Variablen	β	Hazard Ratio	CI (95%)	p
Kutane Autofluoreszenz	-0,07	0,93	0,45 - 1,82	0,84
Männliches Geschlecht	-0,23	0,79	0,56 - 1,13	0,18
Alter	<0,01	1,00	0,96 - 1,05	1,00
Diabetesdauer	0,03	1,03	0,99 - 1,06	0,09
HbA1c (%)	0,17	1,18	0,83 - 1,56	0,30
WHR	2,74	15,43	0,10 - 1860,36	0,28
Aktueller Nikotinabusus	0,4	1,49	0,83 - 2,44	0,15
eGFR (Baseline)	-0,01	0,99	0,97 - 1,01	0,26

Tab. 16: Multivariate Cox-Regression für Neuaufgetretene Albuminurie. Zeitvariable: Dauer von der Baseline- bis zur Follow-up-Untersuchung; Zielvariable: Neuaufgetretene Albuminurie. Signifikante Ergebnisse hervorgehoben.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Dissertation wurde die Assoziation von kutaner Autofluoreszenz mit Nierenphänotypen in Querschnittsanalysen und longitudinal untersucht, und dabei der Einfluss wichtiger Kovariaten auf diese Assoziation analysiert.

Die signifikante Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit Nierenfunktion und verschiedenen Definitionen prävalenter chronischer Nierenerkrankung in der univariaten Querschnittsanalyse konnte in multivariater Analyse für die Phänotypen eGFR, lnUACR und Albuminurie mit nomineller Signifikanz bestätigt werden. In den univariaten, longitudinalen Analysen verschiedener Definitionen des Nierenfunktionsverlusts war die kutane Autofluoreszenz nur mit CKDi25 signifikant assoziiert, was in der multivariaten Analyse nicht bestätigt wurde.

Das Alter zeigte sich als eine der wichtigsten Kovariaten: In den multivariaten Modellen der Querschnittsanalyse war Alter signifikant mit eGFR und CKD sowie in den longitudinalen Modellen mit der jährlichen eGFR-Abnahme, Rapid5 und CKDi25 assoziiert. Baseline eGFR, Diabetesdauer, HbA1c, WHR und aktueller Nikotinkonsum zeigten teilweise Assoziation mit den untersuchten Endpunkten.

5.2 Im Kontext der aktuellen Forschung

Im Folgenden soll auf drei prospektive Studien (Renal Risk in Derby (RRID)-Studie [38, 68], eine Studie von Tanaka et al. [67] und die Zwolle Outpatient Diabetes project Integrating Available Care (ZODIAC)-Studie [69, 70]) eingegangen werden, die sich mit der kutanen Autofluoreszenz und Nierenschäden beschäftigen sowie auf eine Querschnittsstudie von Noordzij et al. [71].

Die prospektive RRID Kohortenstudie schloss 1707 Patienten mit CKD im Stadium 3 ein [38, 68]: Das Durchschnittsalter lag mit 72,9 Jahren über dem Altersdurchschnitt der DIACORE-Teilnehmer. 16,6% der Probanden litten unter Diabetes. Bei allen Teilnehmern wurde die kutane Autofluoreszenz mit einem baugleichen AGE-Reader gemessen. In der Baseline-Untersuchung ergab sich dabei ein Durchschnittswert von 2,7. Bei der Baseline-Querschnittsanalyse konnte in einer multivariaten Regression mit der kutanen Autofluoreszenz als Zielvariable bei dem Subkollektiv der Patienten mit Diabetes mellitus ein signifikanter Effekt von Hämoglobin, Urin-Protein-Kreatinin-Ratio, Geschlecht, diastolischem Blutdruck und Pulswellengeschwindigkeit nachgewiesen werden. Insgesamt waren in der RRID-Studie Patientenalter, Hämoglobin, prävalenter Diabetes mellitus und eGFR die stärksten unabhängigen Determinanten der kutanen Autofluoreszenz. Diese Faktoren sind bereits bekannte Risikofaktoren für eine Progression der CKD bzw. für kardiovaskuläre Ereignisse. In der RRID-Studie wird daher in der kutanen Autofluoreszenz einen möglichen, einzelne andere Faktoren bündelnden Risikofaktor und damit einen möglichen Prädiktor für das kardiovaskuläre und renale Risiko bei CKD-Patienten gesehen [38]. Allerdings handelt es sich hierbei ausschließlich um eine Querschnittsanalyse, longitudinale Untersuchungen wurden zu diesem Thema nicht durchgeführt. Außerdem wurden bei diesen Querschnittsanalysen die Einflussfaktoren auf die kutane Autofluoreszenz bestimmt, nicht die statistischen Effekte der kutanen Autofluoreszenz auf bestimmte Endpunkte. Die Aussage, die kutane Autofluoreszenz könnte ein Prädiktor für renales und kardiovaskuläres Risiko darstellen, wurde nicht untersucht.

Eine longitudinale Analyse der RRID-Studie erbrachte, dass hohe Autofluoreszenzwerte der Haut mit einer gesteigerten Mortalität assoziiert waren. Dieser Zusammenhang ließ sich allerdings nach Adjustierung für Kovariaten nicht bestäti-

gen: Alter, KHK, Albuminurie und eine Abnahme der eGFR erhöhten signifikant das Mortalitätsrisiko, die kutane Autofluoreszenz hingegen nicht [68]. Der in der RRID-Studie gesehene wichtige Einfluss von Kovariaten in der Bewertung der kutanen Autofluoreszenz als Risikoprädiktor wird in meinen Analysen für renale Phänotypen bestätigt.

Tanaka et al. untersuchten den Zusammenhang der kutanen Autofluoreszenz mit der Krankheitsprogression bei 416 japanischen nicht dialysepflichtigen CKD-Patienten in einer prospektiven Kohortenstudie [67]: Auch hier wurde die Autofluoreszenz mithilfe des gleichen AGE-Readers bei der baseline-Untersuchung bestimmt. 50% der Probanden waren männlich, das Durchschnittsalter lag bei 64 Jahren, 131 der 416 Patienten litten an Diabetes mellitus Typ 2, es wurde eine mediane Autofluoreszenz von 2,06 gemessen. Nach einem medianen Zeitintervall bis zum Follow-up von 39 Monaten zeigte sich, dass die kutane Autofluoreszenz bei Patienten, die in dieser Zeit eine Verdopplung der Serum-Kreatinin-Werte und ESRD mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie entwickelten, signifikant höher war, als beim Rest des Kollektivs. In einer multivariaten Analyse zeigte sich die kutane Autofluoreszenz, neben Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinabusus, Baseline-eGFR, Proteinurie und Serum-Albumin als ein signifikanter Risikofaktor für die Krankheitsprogression bei CKD. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses werteten Tanaka et al. die kutane Autofluoreszenz als unabhängigen, starken Vorhersagewert für das Fortschreiten der chronischen Nierenkrankheit [67]. Kritisch anzumerken ist, dass bei den multivariaten Analysen dieser Studie Geschlecht und Alter nicht als Kovariaten mit einbezogen wurden. Besonders letzteres ist als wichtiger Confounder zu sehen (vgl. [63]), da das Alter sowohl einen deutlichen Effekt auf die kutane Autofluoreszenz [64] als auch auf die Krankheitsprogression von CKD hat [72]. Somit ist das Ergebnis dieser Studie nur eingeschränkt zu verwerten.

Während sich die Patientenkollektive der RRID-Studie und der Studie von Tanaka et al. deutlich von dem der DIACORE-Studie unterscheiden (DIACORE schließt ausschließlich Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ein, die anderen beiden Studien hingegen ausschließlich CKD-Patienten) ist das Kollektiv der ZODIAC-Studie vergleichbar mit dem Kollektiv dieser Arbeit. Die ZODIAC Studie ist die einzige

bisher veröffentlichte Studie, die ebenfalls prospektiv den Einfluss der kutanen Autofluoreszenz auf die Entwicklung renaler Funktionseinschränkungen nicht dialysepflichtigen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht [69, 70]. Es handelt sich um eine prospektive Kohortenstudie aus den Niederlanden mit 973 Diabetes mellitus Typ 2 Patienten (Baseline). Die kutane Autofluoreszenz wurde bei allen Patienten ebenfalls mit dem AGE-Reader ermittelt. Bei der Baseline-Untersuchung wurde ein durchschnittlicher Wert von 2,79 gemessen (2,38 (\pm 0,5) in dieser Arbeit). Das durchschnittliche Patientenalter beider Studien lag bei rund 66 Jahren und die Patientenzahlen sind in einer vergleichbaren Größenordnung (973 Teilnehmer der ZODIAC-Studie gegenüber 789 Patienten in dieser Studie). Unterschiede gibt es zum Beispiel in der Geschlechterverteilung (47% Männer bei ZODIAC, 61% bei DIACORE). Zudem leiden die Patienten in DIACORE im Mittel deutlich länger (10,5 Jahre) an Diabetes als in ZODIAC (6,3 Jahre). Die Autofluoreszenz der Haut war in einer zunächst durchgeführten Querschnittsanalyse neben Alter, Geschlecht und Nikotinabusus mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. Es wurde gezeigt, dass für bestimmte Subgruppen die kutane Autofluoreszenz eine sinnvolle Erweiterung des United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)-Risiko-Scores [73] zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos sein kann: In Patienten mit einem nach dem UKPDS-Score hohen Risiko für ein fatales kardiovaskuläres Ereignis ($>10\%$ innerhalb der nächsten 10 Jahre) hatten diejenigen mit einem kutanen Autofluoreszenzwert über dem Median eine deutlich höhere Rate an kardiovaskulären Ereignissen (55,8%), als die Patienten mit einem Fluoreszenzwert unterhalb des Medians (38,9%) [70]. In der darauf folgenden longitudinalen Analyse der ZODIAC-Studie war die Baseline Autofluoreszenz der Haut in jenen Patienten deutlich höher, die nach einer mittleren Follow-up-Dauer von 3,1 Jahren eine diabetische Neuropathie oder Albuminurie entwickelten. In der multivariaten Regression war die kutane Autofluoreszenz neben HbA1c, Geschlecht und Diabetesdauer ein unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung von Albuminurie [69]. Die ZODIAC-Studie zeigt somit, dass die kutane Autofluoreszenz ein Risikoprädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse und für inzidente Albuminurie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist. Allerdings wurde in den Modellen der ZODIAC-Studie nicht für Alter adjustiert. Das Alter hat einen maßgeblichen Effekt auf die kutane Autofluoreszenz [64] und auf die Entwicklung einer Albuminurie

[74], so dass es als wichtiger Confounder in die multivariaten Analysen der ZODIAC-Studie hätte eingeschlossen werden müssen (vgl. [63]). Möglicherweise erklärt dies die Diskrepanz zu meinen Analysen, in denen nach Adjustierung für relevante Kovariaten inklusive Alter und Geschlecht die kutane Autofluoreszenz kein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer Albuminurie ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vergleichbare prospektive Studien (Tanaka et al. [67], ZODIAC [69, 70]), die einen prädiktiven Wert der kutanen Autofluoreszenz auf die Entwicklung renaler Endpunkte postulieren, das Alter als wichtigen Confounder vernachlässigt haben und somit nur eingeschränkt verwertbar sind. Die RRID Studie [38, 68] kommt nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, kardiovaskulärer Erkrankung, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, aktuellen Nikotinabusus und abdomineller Adipositas zu dem Ergebnis, dass die kutane Autofluoreszenz keinen signifikanten Vorhersagewert für die Mortalität von CKD-Patienten darstellt.

Andere Studien beleuchten in Querschnittsanalysen die Assoziation von kutaner Autofluoreszenz und dem Outcome speziell bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Noordzij et al. maßen hierfür bei 616 Typ 2 Diabetikern in den Niederlanden die kutane Autofluoreszenz mithilfe des AGE-Readers. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 64 Jahre, 48% waren männlich. Die mediane kutane Autofluoreszenz lag bei 2,77. Hier wurde in einer multivariaten Regression eine signifikante Assoziation von kutaner Autofluoreszenz mit dem Vorliegen von mikrovaskulären Diabeteskomplikationen als Endpunkt nachgewiesen (Odds Ratio 1,60; $p < 0,01$). Weitere signifikante Faktoren waren Diabetesdauer und eGFR. HbA1c, Alter, Geschlecht, Raucher Status, systolischer Blutdruck und Dyslipidämie korrelierten nicht signifikant mit den mikrovaskulären Erkrankungen [71]. Da sämtliche mikrovaskulären Diabeteskomplikationen zu einem Endpunkt zusammengefasst wurden, ist eine präzisere Beleuchtung der Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der renalen Funktion nicht möglich. Leider wurden von dieser Studie bislang keine longitudinalen Analysen veröffentlicht.

5.3 Klinische Auswirkungen

Die Anschaffung eines AGE-Readers für den täglichen Einsatz in der klinischen Routine zur renalen Risikoeinschätzung ist zu hinterfragen, da bisher keine prospektive Studie einen prädiktiven Wert der kutanen Autofluoreszenz für die Entwicklung renaler Endpunkte stichhaltig belegen konnte. Auch diese Arbeit kann keine signifikante Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit inzidenten renalen Endpunkten nachweisen.

5.4 Stärken und Grenzen dieser Arbeit

Wichtige Stärken dieser Studie sind die große Fallzahl, die hochauflösende Phänotypisierung, die Bestimmung der renalen Laborparameter in einem Zentrallabor mit zertifizierter Qualitätskontrolle und die prospektive Analyse.

Die post hoc durchgeführte Poweranalyse der Querschnittsanalysen zeigt, dass bei den signifikanten Ergebnissen der Regressionen für eGFR und InUACR die Power niedrig ist. Bei ausreichenden Patientenzahlen wären folglich die beobachteten Effekte noch deutlicher hervorgetreten. Das Ergebnis der Querschnittsanalyse für Albuminurie war signifikant, die Power ausreichend, so dass von einem validen Ergebnis ausgegangen werden kann. Für CKD konnte bei der multivariaten Regression kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Bei einer Power von 0,94 ist mit der Richtigkeit der Annahme der Nullhypothese zu rechnen. Das zeigt, dass sich auch bei höheren Patientenzahlen das Ergebnis dieser vier Analysen (eGFR, InUACR, Albuminurie, CKD) nicht geändert hätte.

Das Ergebnis der Regression für die jährliche eGFR-Abnahme war nicht signifikant. Gleichzeitig war die Power unzureichend (0,32). Der Effekt ist hier so gering, dass höhere Patientenzahlen nötig wären, um eine Aussage treffen zu können.

Bei der Messung der kutanen Autofluoreszenz werden die nichtfluoreszierenden AGEs nicht direkt erfasst [7]. Die Arbeit von Meerwaldt et al. lässt allerdings darauf schließen, dass die fluoreszierenden und die nicht fluoreszierenden AGEs gut miteinander und mit der kutanen Autofluoreszenz korrelieren [57]. Eine Entnahme von Gewebeproben zur Bestimmung der AGEs wäre zwar der Goldstandard, ist

aber invasiv und somit ethisch problematisch. Die Bestimmung der AGEs im Serum ist Gegenstand der Planung für folgende Follow-up-Untersuchungen.

Die Berechnungen hatten das Ziel, einen möglichen Effekt der kutanen Autofluoreszenz auf inzidente Nierenschäden bei Diabetes offenzulegen. Daher wurde die kutane Autofluoreszenz als unabhängige Variable gewählt, die renalen Endpunkte als abhängige Variablen. Dabei wurde zwangsläufig außen vor gelassen, dass eine Einschränkung der Nierenfunktion (ins Besondere eine verminderte GFR) aufgrund der reduzierten renalen Elimination auch Ursache eines erhöhten AGE-Spiegels und damit langfristig auch Ursache einer Zunahme der kutanen Autofluoreszenz sein kann [38, 39]. So könnte der signifikante Zusammenhang der kutanen Autofluoreszenz mit der eGFR (Gliederungspunkt **4.2.1**) auch Zeichen einer vermehrten AGE-Akkumulation durch eine verminderte Elimination sein. Die Nierenfunktionseinschränkung könnte hier also Ursache und nicht Folge sein. Um dieser Problematik gerecht zu werden, wurde die eGFR der Baseline-Untersuchung bei den longitudinalen Analysen als Confounder behandelt und folglich als Kovariate in die multivariaten Berechnungen mit einbezogen.

5.5 Zusammenfassung

Für die prospektive Kohortenstudie DIACORE wurden 3000 Patienten mit Diabetes Typ 2 rekrutiert. In dieser Arbeit geht es um ein zufällig ausgewähltes Subkollektiv von 789 Patienten, an denen zusätzlich zum standardisierten DIACORE-Studienprotokoll die Messung der kutanen Autofluoreszenz als Maß für die Advanced Glycation Endproducts mithilfe des AGE-Readers durchgeführt wurde. Zielsetzung war die Untersuchung der Assoziation von kutaner Autofluoreszenz mit der prävalenten renalen Funktion und Albuminurie sowie mit der Entwicklung renaler Funktionseinschränkungen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Etwa 61% der Probanden in diesem Kollektiv sind männlich, das durchschnittliche Alter beträgt 66 Jahre bei einer mittleren Diabetesdauer von 10 Jahren. Es wurde im Durchschnitt ein kutaner Autofluoreszenzwert von 2,38 gemessen. In der Querschnittsanalyse konnte vor Adjustierung eine signifikante Korrelation der kutanen Autofluoreszenz mit der eGFR, der InUACR sowie dem

Vorliegen von Albuminurie und CKD aufgezeigt werden. Nach Einbeziehung der Kovariaten (Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, HbA1c, WHR und aktueller Nikotin Abusus) konnte eine signifikante Assoziation der kutanen Autofluoreszenz hinsichtlich eGFR, InUACR und Albuminurie bestätigt werden. Für die longitudinalen Berechnungen wurde der Zusammenhang der kutanen Autofluoreszenz mit bestimmten renalen Endpunkten (jährliche eGFR-Abnahme; Rapid5: jährliche eGFR-Abnahme um mindestens 5 ml/min/1,73m²; Rapid3: jährliche eGFR-Abnahme um mindestens 3 ml/min/1,73m²; CKDi25: Neuauftreten von CKD bei einer eGFR-Abnahme von mindestens 25%; Neuauftretene Albuminurie) in der Zeitspanne zwischen Baseline- und Follow-up-Untersuchung beleuchtet. In den univariaten Analysen konnte nur die signifikante Korrelation der Autofluoreszenz mit der Variablen CKDi25 gesehen werden. In den multivariaten Analysen (Kovariaten wie in Querschnittsanalyse, zusätzliche Adjustierung für Baseline-eGFR) konnte die kutane Autofluoreszenz für keinen der untersuchten Parameter als Risikofaktor identifiziert werden.

6. Fazit

Multivariate Regressionen zeigten im Querschnitt eine signifikante Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit Nierenfunktion und Albuminurie (eGFR, InUACR, Albuminurie). Mit CKD konnte kein Zusammenhang bestätigt werden. In den longitudinalen multivariaten Analysen ergab sich kein signifikanter Zusammenhang der kutanen Autofluoreszenz mit einer der renalen Zielvariablen. Ein prädiktiver Wert der kutanen Autofluoreszenz für die Entwicklung renaler Komplikationen bei Diabetes mellitus Typ 2 kann in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zukünftige prospektive Analysen der DIACORE-Studie unter Einbeziehung weiterer Daten und weiterer Follow-ups sollen mehr Aufschluss über die Assoziation der kutanen Autofluoreszenz mit der Nierenfunktion bei Diabetes mellitus und ihren prädiktiven Wert geben und so das Verständnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie stärken.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AGE	Advanced glycation endproduct
AGE-R1	Oligosaccharyltransferase-48
AGE-R3	Galectin-3
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
Ang II	Angiotensin II
AOK	Allgemeine Ortskrankenkasse
AT1	Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
CEL	Carboxyethyllysin
CI	Konfidenzintervall
CKD	Chronic Kidney Disease; Chronische Nierenkrankheit
CKDEPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
cm	Zentimeter
CML	Carboxymethyllysin
CPAP	Continous Positive Airway Pressure
DAK	Deutsche Angestellten Krankenkasse
DIACORE	Diabetes Cohorte
dl	Deziliter
Dr.	Doktor
eCRF	Electronic case report form
e.g.	Exempli gratia
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESRD	Endstage renal disease

et al.	Et alii / et aliae
GE	General Electric
GEK	Gmünder Ersatzkasse
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High density lipoprotein
HMGB1	High mobility group box 1
hsCRP	High sensitivity C-reactive protein
IDF	International Diabetes Federation
IKK	Innungskrankenkasse
IL2	Interleukin 2
IQR	Interquartile range
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
kg	Kilogramm
LDL	Low density lipoprotein
lnUACR	Logarithmierte Urin-Albumin-Kreatinin-Ratio
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
p	Probability; Signifikanzwert
Prof.	Professor
RAGE	Rezeptor für Advanced glycation endproducts
ROS	Reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci

RRID	Renal risk in Derby
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte
SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TKK	Techniker Krankenkasse
UACR	Urin-Albumin-Kreatinin-Ratio
UKPDS	United Kingdom prospective diabetes study
USA	United States of America
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WHR	Waist Hip Ratio; Taillen-Hüftumfang-Quotient
z.B.	zum Beispiel
ZODIAC	Zwolle outpatient diabetes project integrating available care

7.2 Literaturverzeichnis

1. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
2. Huber, C.A., et al., *Epidemiology and costs of diabetes mellitus in Switzerland: an analysis of health care claims data, 2006 and 2011*. BMC Endocr Disord, 2014. **14**: p. 44.
3. Koster, I., et al., *Direct costs of diabetes mellitus in Germany - CoDiM 2000-2007*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2011. **119**(6): p. 377-85.
4. Jonsson, B., *Revealing the cost of Type II diabetes in Europe*. Diabetologia, 2002. **45**(7): p. S5-12.
5. Rathmann, W., et al., *Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(19): p. 331-7.
6. Gregg, E.W., et al., *Trends in death rates among U.S. adults with and without diabetes between 1997 and 2006: findings from the National Health Interview Survey*. Diabetes Care, 2012. **35**(6): p. 1252-7.
7. Nowotny, K., et al., *Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus*. Biomolecules, 2015. **5**(1): p. 194-222.
8. Gross, J.L., et al., *Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(1): p. 164-76.
9. Pippias, M., et al., *Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2012 ERA-EDTA Registry Annual Report*. Clin Kidney J, 2015. **8**(3): p. 248-61.
10. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease in the United States*. JAMA, 2007. **298**(17): p. 2038-47.
11. Eckardt, K.U., et al., *Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden*. Lancet, 2013. **382**(9887): p. 158-69.
12. Sohel, B.M., et al., *Renal function trajectory over time and adverse clinical outcomes*. Clin Exp Nephrol, 2016.
13. Adler, A.I., et al., *Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)*. Kidney Int, 2003. **63**(1): p. 225-32.
14. Regele, F., et al., *Genome-wide studies to identify risk factors for kidney disease with a focus on patients with diabetes*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30 Suppl 4**: p. iv26-34.
15. Parving, H.H., et al., *Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy?* Diabetes Care, 2002. **25**(2): p. 406-7.
16. Levey, A.S., et al., *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney Int suppl, 2013. **3**(1): p. 19-63.
17. Harjutsalo, V. and P.H. Groop, *Epidemiology and risk factors for diabetic kidney disease*. Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(3): p. 260-6.
18. Parving, H.H., et al., *Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2012. **367**(23): p. 2204-13.
19. Haller, H., et al., *Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2011. **364**(10): p. 907-17.
20. Gerstein, H.C., et al., *Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **358**(24): p. 2545-59.
21. Mann, J.F., et al., *Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial*. Lancet, 2008. **372**(9638): p. 547-53.
22. Fernandez-Fernandez, B., et al., *Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(6): p. 325-46.

23. European-Union, *IMI 2 Call 5*. www.imi.europa.eu/content/stage-1-16. Accessed August 28, 2015. Accessed August 28, 2015, 2015.
24. Armstrong, V.W. and H.D. Bruhn, *LaborMedizin : Indikationen, Methodik und Laborwerte ; Pathophysiologie und Klinik ; mit ... 66 Tabellen*, Stuttgart: Schattauer. XX, 522 S.
25. Kilpatrick, E.S., *The rise and fall of HbA(1c) as a risk marker for diabetes complications*. Diabetologia, 2012. **55**(8): p. 2089-91.
26. Halwachs-Baumann, G., *Labormedizin*. 2 ed. 2011, Wien: Springer Vienna. p. 347(1-501).
27. Elost, A., T. Ghous, and N. Ahmed, *Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications*. Curr Diabetes Rev, 2012. **8**(2): p. 92-108.
28. Ahmed, N., *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **67**(1): p. 3-21.
29. Tessier, F.J., *The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation*. Pathol Biol (Paris), 2010. **58**(3): p. 214-9.
30. Prasad, A., P. Bekker, and S. Tsimikas, *Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease*. Cardiol Rev, 2012. **20**(4): p. 177-83.
31. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 586-600.
32. Negrean, M., et al., *Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(5): p. 1236-43.
33. Goldberg, T., et al., *Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods*. J Am Diet Assoc, 2004. **104**(8): p. 1287-91.
34. Urbarrri, J., et al., *Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet*. J Am Diet Assoc, 2010. **110**(6): p. 911-16 e12.
35. Nicholl, I.D., et al., *Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers*. Mol Med, 1998. **4**(9): p. 594-601.
36. Cerami, C., et al., *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13915-20.
37. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes, 1991. **40**(4): p. 405-12.
38. McIntyre, N.J., et al., *Skin autofluorescence and the association with renal and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease stage 3*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(10): p. 2356-63.
39. Thornalley, P.J. and N. Rabbani, *Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease*. Semin Dial, 2009. **22**(4): p. 400-4.
40. Basta, G., *Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications*. Atherosclerosis, 2008. **196**(1): p. 9-21.
41. Schmidt, A.M., et al., *Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14987-97.
42. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14998-5004.
43. Win, M.T., et al., *Regulation of RAGE for attenuating progression of diabetic vascular complications*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 894605.
44. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. 88-102.
45. Hori, O., et al., *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25752-61.

46. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. *Circ Res*, 2010. **107**(9): p. 1058-70.
47. Stinghen, A.E., et al., *Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD*. *J Am Soc Nephrol*. **27**(2): p. 354-70.
48. Cai, W., et al., *AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **294**(1): p. C145-52.
49. Soulis, T., et al., *Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury*. *Diabetologia*, 1997. **40**(6): p. 619-28.
50. Monnier, V.M., D.R. Sell, and S. Genuth, *Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1043**: p. 567-81.
51. Yamagishi, S. and T. Matsui, *Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. **3**(2): p. 101-8.
52. Vlassara, H., *Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications*. *Diabetes*, 1997. **46 Suppl 2**: p. S19-25.
53. Ramasamy, R., et al., *Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation*. *Glycobiology*, 2005. **15**(7): p. 16R-28R.
54. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells*. *Kidney Int*, 2003. **63**(2): p. 464-73.
55. Fukami, K., et al., *AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction*. *Kidney Int*, 2004. **66**(6): p. 2137-47.
56. Poulsen, M.W., et al., *Advanced glycation endproducts in food and their effects on health*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **60**: p. 10-37.
57. Meerwaldt, R., et al., *Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation*. *Diabetologia*, 2004. **47**(7): p. 1324-30.
58. Dorhofer, L., et al., *Study design of DIACORE (DIAbetes COhoRtE) - a cohort study of patients with diabetes mellitus type 2*. *BMC Med Genet*, 2013. **14**: p. 25.
59. Pischon, T., et al., *General and abdominal adiposity and risk of death in Europe*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(20): p. 2105-20.
60. Koetsier, M., et al., *Reference values of skin autofluorescence*. *Diabetes Technol Ther*, 2010. **12**(5): p. 399-403.
61. Diagnostics, *Compliance report to NEN-EN-IEC 62471, in Document number: DI-A-01-501.1*. 2008: Groningen, NL.
62. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(9): p. 604-12.
63. Jager, K.J., et al., *Confounding: what it is and how to deal with it*. *Kidney Int*, 2008. **73**(3): p. 256-60.
64. Oleniuc, M., et al., *Consequences of Advanced Glycation End Products Accumulation in Chronic Kidney Disease and Clinical Usefulness of Their Assessment Using a Non-invasive Technique - Skin Autofluorescence*. *Maedica (Buchar)*, 2011. **6**(4): p. 298-307.
65. Schleicher, E.D., E. Wagner, and A.G. Nerlich, *Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(3): p. 457-68.
66. Tanaka, K., et al., *Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients*. *Nephrol Dial Transplant*. **26**(1): p. 214-20.
67. Tanaka, K., et al., *Skin autofluorescence is associated with the progression of chronic kidney disease: a prospective observational study*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83799.

68. Fraser, S.D., et al., *Skin autofluorescence and all-cause mortality in stage 3 CKD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(8): p. 1361-8.
69. Gerrits, E.G., et al., *Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications*. Diabetes Care, 2008. **31**(3): p. 517-21.
70. Lutgers, H.L., et al., *Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 789-97.
71. Noordzij, M.J., et al., *Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study*. Diabet Med, 2012. **29**(12): p. 1556-61.
72. Khan, Y.H., et al., *Progression and outcomes of non-dialysis dependent chronic kidney disease patients: A single center longitudinal follow-up study*. Nephrology (Carlton), 2015.
73. Stevens, R.J., et al., *The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56)*. Clin Sci (Lond), 2001. **101**(6): p. 671-9.
74. Afghahi, H., et al., *Risk factors for the development of albuminuria and renal impairment in type 2 diabetes--the Swedish National Diabetes Register (NDR)*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(4): p. 1236-43.

7.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Carsten Böger meinen herzlichsten Dank aussprechen für die Vergabe des Themas der vorliegenden Arbeit, die zuverlässige Unterstützung, wohlwollende Begleitung und Förderung, für seine konstruktive Kritik und vor allem für seine Fähigkeit, mich für die wissenschaftliche Arbeit zu begeistern.

Frau Prof. Dr. Iris Heid danke ich besonders für ihre Bereitschaft, die Zweitbegutachtung der vorliegenden Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Banas danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik zu erstellen.

Außerdem möchte ich dem gesamten Team der DIACORE-Studie meinen Dank aussprechen, insbesondere Frau Sarah Hufnagel und Frau Simone Neumeier.

Herrn Christian Scholz danke ich für seine stets ruhige und kompetente telefonische Soforthilfe bei technischen Ausfällen.

Meiner Kommilitonin und Ko-Doktorandin Frau Britta Hörrmann möchte ich herzlich für ihren freundschaftlichen Beistand danken.

Zudem möchte ich meiner guten Freundin Frau Edna Busch für geduldige Korrekturarbeiten danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meinen Freunden, deren Unterstützung mir alles bedeutet.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die aus anderen Quellen übernommenen Zitate, Konzepte, Tabellen oder Abbildungen sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer mit den Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe, zu erwerben.

Ort, Datum

Konstantin Dumann