

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor Prof. Dr. med. K. Werdan)

Endotheliale Funktion und Subgruppen der Monozyten bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Peggy Güntner
geboren am 23.03.1986 in Elsterwerda

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. A. Schlitt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Axel Schlitt
2. Prof. Dr. med. Wolfgang Ballhausen
3. PD Dr. med. Dagmar Riemann

Tag der Eröffnung: 08.10.2013

Tag der Verteidigung: 23.09.2014

Referat

Bis heute ist die Koronare Herzerkrankung als koronare Manifestation der Atherosklerose führende Todesursache in Deutschland. Bereits vor deren klinischer Manifestation findet sich eine endotheliale Dysfunktion der koronararteriellen Gefäßwand. Diese ist insbesondere gekennzeichnet durch eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), was zur Anlagerung von Lipoproteinen an das Endothel führt. Die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen wird induziert und Leukozyten, vor allem Monozyten und T-Lymphozyten, werden zum Läsionsort rekrutiert. Sie proliferieren dort zu lipidbeladenen Schaumzellen und unterhalten die inflammatorische Reaktion durch weitere Zytokinproduktion. Im Jahr 1989 beschrieb Passlick erstmals die Subpopulation der CD16-positiven Monozyten, die im Gegensatz zu den klassischen Monozyten vermehrt proinflammatorische Zytokine exprimiert und unter anderem bei Patienten mit KHK in höherer Konzentration gefunden wurde. Der pathophysiologisch plausible Zusammenhang zwischen CD16+Monozyten und endothelialer Dysfunktion ist bislang jedoch weitgehend unerforscht, was den Anlass zur vorliegenden Studie gab.

An 120 Patienten (80 mit koronarangiografisch gesicherter KHK und 40 Kontrollpatienten) wurde die Endothelfunktion nach dem Prinzip der blutflussinduzierten reaktiven Hyperämie mittels RH-PAT-Technologie gemessen (EndoPAT 2000, Itamar®) und die Monozytensubpopulationen aus dem venösen Vollblut nach Markierung mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern durchflusszytometrisch untersucht (FACS Calibur von BD, Heidelberg). Eine endotheliale Dysfunktion gemäß PAT-Index war bei Patienten mit KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe häufiger (1,61 (1,38/1,85) vs. 1,81 (1,62/2,18); $p < 0.001$). Weiterhin korrelierte der PAT-Index mit dem Vorliegen einer Dyslipoproteinämie ($p = 0,045$), einer erhöhten Waist-Hip-Ratio ($p = 0,041$) und dem Retentionsparameter Kreatinin ($p = 0,021$). Bei der Auswertung der Monozytensubgruppen wurden CD14⁺⁺/CD16-Monozyten (39,3%), CD14⁺⁺/CD16⁺Monozyten (35,2%) und CD14⁻/CD16⁺Monozyten (25,6%) voneinander unterschieden. Es fand sich jedoch keine Korrelation mit der Endothelfunktion, weder für Patienten mit KHK noch für die Kontrollgruppe. Für das Follow up wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt (PAT-Index $> 2,0$, 1,67-2,0; $< 1,67$). Von insgesamt neun Todesfällen gehörten sechs zur Gruppe mit einer gestörten Endothelfunktion, jedoch zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang im Vergleich der Gruppen ($p = 0,281$).

Zusammenfassend sind nach den vorliegenden Daten proatherosklerostische Subgruppen der Monozyten nicht mit endothelialer Dysfunktion, gemessen mit dem PAT-Index, assoziiert. Obwohl eine endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit KHK häufiger als bei Kontrollen war und Todesfälle numerisch häufiger in der Gruppe derer mit gestörter Endothelfunktion auftraten, zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der endothelialen Dysfunktion zum primären Endpunkt Gesamttod. Somit scheinen die gemessenen Parameter, obwohl mit der Pathogenese der Atherosklerose assoziiert, nicht kausal in die Progression der Erkrankung involviert zu sein.

Güntner, Peggy: Endotheliale Dysfunktion und Subgruppen der Monozyten bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Anatomie des koronaren Gefäßsystems	3
1.1.4	Pathogenese der Atherosklerose	4
1.1.5	Manifestationsformen und diagnostische Abgrenzung	5
1.1.6	Therapiemöglichkeiten	6
1.2	Das Endothel	8
1.2.1	Aufbau und Funktion des intakten Endothels	8
1.2.2	Die Rolle des Stickstoffmonoxids	8
1.2.3	Die endotheliale Dysfunktion	10
1.3	Messung der Endothelfunktion	11
1.3.1	Invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion	11
1.3.2	Nichtinvasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion	12
1.3.3	Sonografische Messung der FMD	13
1.3.4	Reactive Hyperemia by Peripheral Arterial Tonometry (RH-PAT)	13
1.4	Die Rolle der CD14+CD16+Monozyten	14
1.4.1	Monozyten und deren Subpopulationen	14
1.4.2	Rolle der CD16+Monozyten als pro-inflammatorische Zellen	15
1.4.3	CD16+Monozyten bei der Entstehung der Atherosklerose	15
2.	Zielstellung	17
3.	Material und Methoden	18
3.1	Studienpopulation	18
3.2	Datenerhebung	18
3.2.1	Anamnestische Angaben	19
3.2.2	Laborparameter	20
3.2.3	Durchführung der Koronarangiografie	24
3.3	Bestimmung der CD14+CD16+Monozyten	25
3.3.1	Blutentnahme	25
3.3.2	CD14+CD16+-Oberflächenfärbung	25
3.3.3	Durchflusszytometrie	27
3.4	EndoPAT-Messung	29
3.4.1	Prinzip	29
3.4.2	Durchführung	30
3.4.3	Analyse	30
3.5	Follow-up	31
3.6	Statistische Auswertung	32
4.	Ergebnisse	33
4.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	33
4.1.1	Anamnestische Angaben und Risikofaktoren	33
4.1.2	Laborwerte	34
4.1.3	Differentialblutbild	36
4.1.4	Medikamenteneinnahme bei Aufnahme	37
4.1.5	Die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im Patientenkollektiv	38
4.1.6	Das Verhalten des RH-PAT-Index im Patientenkollektiv	40
4.2	Korrelation von PAT-Index und weiteren Parametern	40
4.2.1	PAT-Index und kardiovaskuläre Risikofaktoren	40
4.2.2	PAT-Index und Medikamenteneinnahme	42
4.2.3	PAT-Index und Laborwerte	43
4.3	PAT-Index und Monozyten-Subpopulationen	44

4.3.1	Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs	44
4.3.2	Getrennte Betrachtung von Patienten mit KHK und Kontrollgruppe	45
4.4	Follow-up und Überlebensanalyse	47
5.	Diskussion	50
5.1	Die endotheliale Dysfunktion	50
5.1.1	PAT-Index und Risikofaktoren	52
5.1.2	PAT-Index und Laborparameter	53
5.1.3	Endotheliale Dysfunktion und Medikamenteneinnahme	57
5.2	Die Monozyten-Subpopulationen	58
5.2.1	Monozytensubpopulationen bei Patienten mit KHK	60
5.3	Endothelfunktion und Monozytensubpopulation	62
5.4.	Das Risikofaktorprofil im Patientenkollektiv	63
5.5	Fazit	66
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Thesen	80
9.	Anhang	
9.1	Lebenslauf	
9.2	Selbständigkeitserklärung	
9.3	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
9.4	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ABPI	Ankle-Brachial-Pressure-Index
ACB	Aortocoronarer Bypass
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
Ach	Acetylcholin
ACR	Albumin-Creatinin-Ratio
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ARB	Angiotensin-II-Rezeptor-I-Blocker
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BMS	Bare-Metal-Stent
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CCR	Chemokine-(CC-motif)-Receptor
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CRP	C-reaktives Protein
CX3CR1	Chemokine-(C-X3-C-motif)-Receptor
DES	Drug-Eluting-Stent
DLP	Dyslipoproteinämie
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDHF	Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium-derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FA	Familienanamnese
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKN	Fraktalkine
FMD	Flow mediated dilation

FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosin-Triphosphat
Hb	Hämoglobin
HDL	High density lipoprotein
HES	Hypereosinophiles Syndrom
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCA	Left coronary artery (linke Koronararterie)
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	L-Nitro-Arginine-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte-Chemoattractant-Protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrixmetalloproteinasen
Mo1	CD14 ⁺⁺ /CD16-Monozyten
Mo2	CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁺ Monozyten
Mo3	CD14 ⁻ /CD16 ⁺ Monozyten
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MW	Mittelwert
NaN ₃	Natriumazid
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
OAK	Orale Antikoagulation
oxLDL	oxidiertes Low density lipoprotein
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PDGF	Platelet-derived growth factor

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PHAMOS	Prospective Halle Monocyte Study
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RANTES	Regulated upon Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted
RCA	Right coronary artery (rechte Koronararterie)
RCX	Ramus circumflexus
RH-PAT	Reactive hyperemia – peripheral arterial tonometry
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STEMI	ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
TAH	Thrombozytenaggregationshemmer
TF	Tissue Factor
TG	Triglyceride
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	Gewebs-Plasminogenaktivator
UKH	Universitätsklinikum Halle
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHF	Vorhofflimmern/ Vorhofflattern
VLDL	Very low density lipoprotein
WBC	White blood cells
WHR	Waist-Hip-Ratio

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) gehört zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und zählt nach Angaben des Statistischen Bundesamtes zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Im Jahr 2010 waren 41,1% aller Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingt, 22,4% allein durch die ischämische Herzkrankheit. Insgesamt starben im Jahr 2010 57.107 Menschen an einem akuten Myokardinfarkt, 55,8% davon waren Männer, 44,2% Frauen. Damit liegt die KHK in der Todesursachenstatistik vor bösartigen Neubildungen und infektiösen Erkrankungen an erster Stelle (1,2).

Zwar ist die Zahl der atherosklerotisch bedingten Todesfälle in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen, dennoch sind diese Erkrankungen weiterhin die führende Ursache auch für einen vorzeitigen Tod. Der Grund für die sinkenden Zahlen ist nicht geklärt, jedoch werden Faktoren wie bessere Versorgung mit Herzkatheterlaboren, konsequentere Behandlung von Risikofaktoren und das Rauchverbot in Gaststätten und Restaurants diskutiert. Im Jahr 2000 starben in Deutschland pro 100.000 Einwohner 203,8 Personen an ischämischen Herzerkrankungen, im Jahr 2010 waren es noch 162,8 (3).

Definitionsgemäß handelt es sich bei der KHK um die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen. Durch Koronarstenosen kommt es zu Flussbehinderungen, aus denen ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel resultiert. Dies wird als Koronarinsuffizienz bezeichnet. Die hervorgerufene Myokardischämie kann klinisch stumm bleiben, sich chronisch als stabile Angina pectoris äußern oder als akutes Koronarsyndrom manifest werden. Weiterhin kann eine ischämische Myokardschädigung zu einer Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen sowie einem plötzlichen Herztod führen (4).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung, die bis heute nicht kausal behandelt werden kann, sodass hier der Prävention und Identifizierung von Risikofaktoren eine besondere Bedeutung zukommt.

In der Framingham Heart Studie, die 1948 in der Nähe von Boston, Massachusetts, begonnen wurde, konnten zahlreiche dieser Risikofaktoren identifiziert und in weiteren Studien bestätigt und ergänzt werden. Demnach können die kardiovaskulären Risikofaktoren in zwei Gruppen unterteilt werden, die beeinflussbaren und die nicht beeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den ersteren zählen das Rauchen, die arterielle Hypertonie, die Dyslipoproteinämie (LDL-Cholesterin-Erhöhung, HDL-Cholesterin-Erniedrigung, Triglyceriderhöhung, u.a.), die Adipositas (hier vor allem die viszerale

Adipositas) und der Diabetes mellitus. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren gehören das Alter, das männliche Geschlecht, bei Frauen die Postmenopause und eine genetische Prädisposition (positive Familienanamnese) (5,6).

In den letzten Jahren wurden zudem viele weitere Risikofaktoren beschrieben, deren klinische Bedeutung teilweise noch umstritten ist. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das C-reaktive Protein als Akut-Phase-Protein und damit als inflammatorischer Marker mit dem kardiovaskulären Risiko korreliert. Auch andere Entzündungsparameter, z.B. Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Infektionserreger wie Chlamydia pneumoniae stehen im Verdacht, das Risiko zu erhöhen (7). Als eigenständiger Risikofaktor gilt das Fibrinogen, welches mit seinen prokoagulatorischen Eigenschaften eine thrombotische Diathese fördert und seinerseits auch ein Akut-Phase-Protein darstellt. Die Rollen des Homocystein, des Lipoprotein(a) und der Myeloperoxidase sind derzeit noch unklar und Gegenstand weiterer Forschungsarbeit (8,9).

Die Reduzierung aller beeinflussbaren Risikofaktoren steht an erster Stelle der Therapie und Prävention von atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Dazu gehören eine Senkung des Körpergewichts durch Diät und Bewegung, Nikotinverzicht, eine optimale Blutdruck- und Blutzuckereinstellung sowie eine lipidmodulierende Therapie.

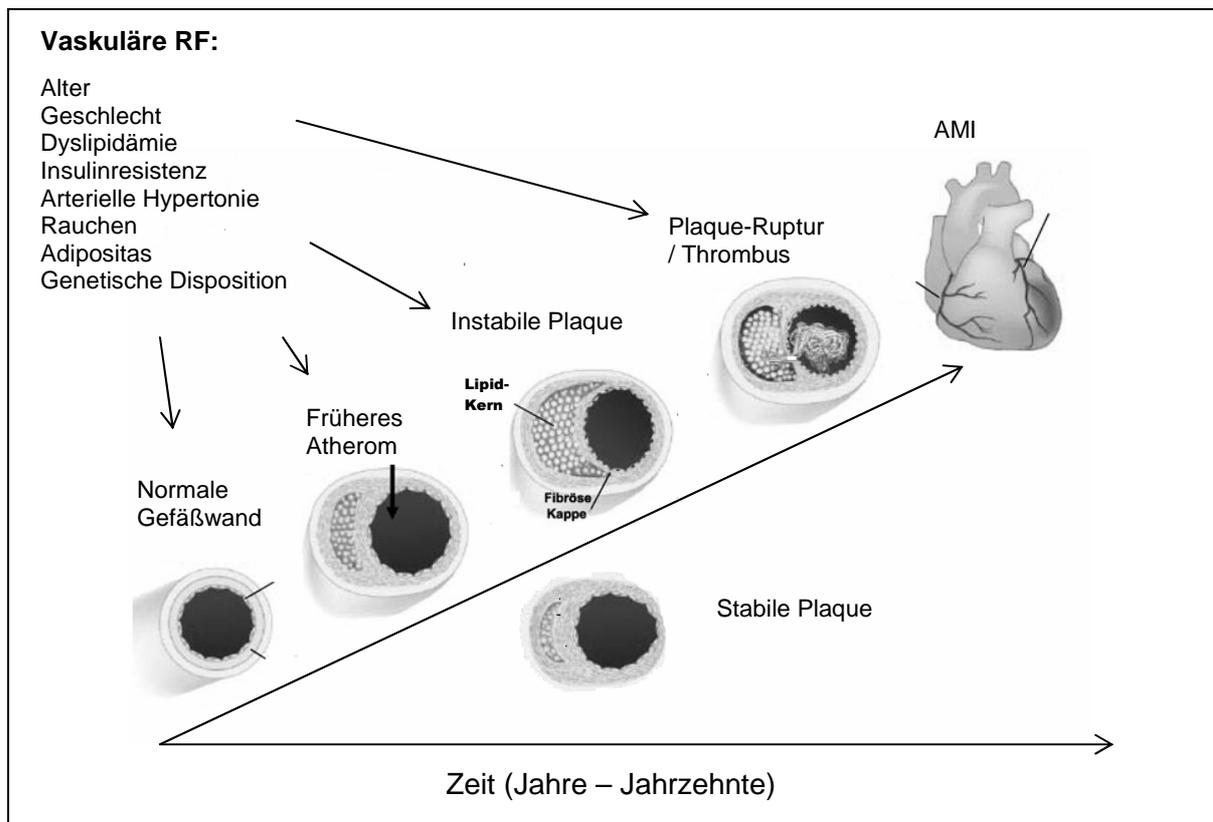


Abb. 1 Pathogenese der Atherosklerose. Einfluss vaskulärer Risikofaktoren auf Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques (nach 10) (RF: Risikofaktoren; AMI: Akuter Myokardinfarkt)

1.1.3 Anatomie des koronaren Gefäßsystems

Die Durchblutung des Herzmuskels erfolgt in der Regel durch drei epikardiale Hauptgefäße, die in ihrem Verlauf zahlreiche Äste abgeben. Man unterscheidet die linke (LCA) von der rechten Koronararterie (RCA). Die LCA teilt sich in den RIVA (Ramus interventricularis anterior) oder auch LAD (Left anterior descending artery) und den RCX (Ramus circumflexus). Der RIVA versorgt neben der Herzvorderwand mit seinen septalen Ästen einen Großteil des Ventrikelseptums, der RCX versorgt in der Regel die laterale Wand des linken Ventrikels. Die RCA ist für die Versorgung vor allem des rechten Herzens sowie der diaphragmalen Anteile des Septums und des linken Ventrikels zuständig. Da sie den rechten Vorhof und damit sowohl Sinus- als auch AV-Knoten versorgt, spielt sie eine Bedeutung bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen. Abweichend von diesem „ausgeglichener Typ“, der nur bei etwa 50% aller Menschen zu finden ist, kennt man einen Links- und einen Rechtsversorgungstyp sowie zahlreiche funktionell unbedeutende und bedeutende Koronaromalien (10).

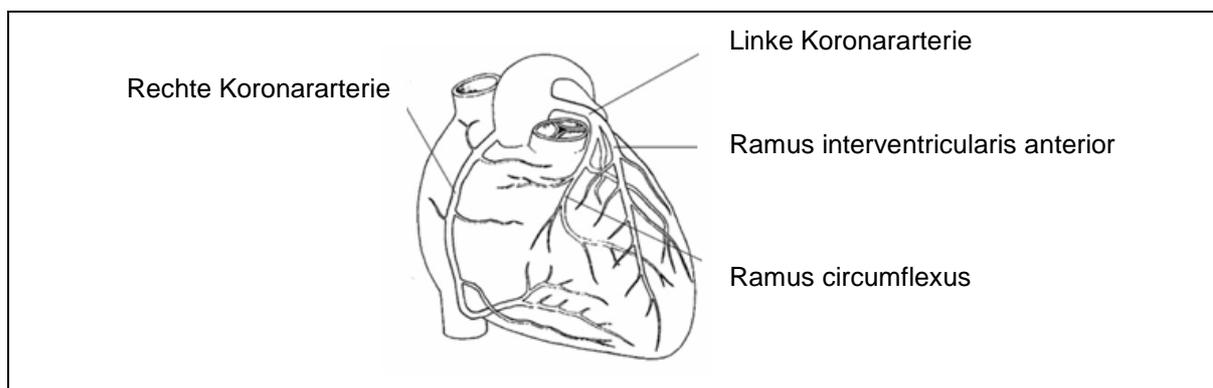


Abb. 2 Anatomie des koronaren Gefäßsystems (nach 10)

Reguliert wird die Myokarddurchblutung durch verschiedene Faktoren: humorale und metabolische Einflüsse regulieren den Gefäßtonus, ebenso chemische Mediatoren des Gefäßendothels. Da es systolisch zu einer Kompression der Koronararterien kommt und die geöffneten Taschen der Aortenklappen den systolischen Blutfluss in die Koronarien behindern, findet die Durchblutung zum größten Teil während der Diastole statt. Außerdem beeinflussen der Aortendruck, der diastolische Ventrikeldruck sowie die Sauerstoffsättigung des Blutes die koronare Durchblutung. In Belastungssituationen kann die Durchblutung beim Gesunden um das Vierfache gesteigert werden, bei bestehenden Stenosen kann im Regelfall bis zu einem Stenosegrad von 50% der Perfusionsdruck distal der Stenose kompensiert werden (Koronarreserve). Dies geschieht durch eine poststenotische Dilatation und damit Senkung des Gefäßwiderstandes. Bei höhergradigen Stenosen ist dieser Kompensationsmechanismus eingeschränkt und Symptome stellen sich vor allem bei Belastung ein (Ischämieschwelle) (11).

1.1.4 Pathogenese der Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose wurde über Jahrzehnte ausschließlich als Folge der Ablagerung von Lipiden an der inneren Gefäßwand betrachtet. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich hierbei jedoch um ein sehr viel komplexeres Geschehen, das vor allem durch inflammatorische Mechanismen initiiert und unterhalten wird.

Initial kommt es zu einer Funktionsstörung des Gefäßendothels. Die genauere Funktion der Endothelzellen und die Mechanismen der endothelialen Dysfunktion werden im Folgenden noch dargestellt. Durch die genannte endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen, sodass sich vermehrt Lipoproteine an die extrazelluläre Matrix der Intima und deren Glukosaminoglykane binden können. Dort werden diese Lipoproteine, vor allem LDL (low density lipoprotein), oxidativ modifiziert und induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen aus Leukozyten und Endothelzellen. Außerdem stimulieren sie die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, Interleukin-1 und TNF- α , die wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen fördern. Diese Mechanismen werden durch laminare Scherkräfte am Endothel unterdrückt, sodass an Stellen mit vermehrt turbulenten Strömungsverhältnissen und damit geringeren Scherkräften, z.B. Gefäßbifurkationen, eine erhöhte Atheroskleroseneigung besteht. Im weiteren Verlauf der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque kommt es nun zur Akkumulation von Leukozyten in die Gefäßwand, wobei es sich vor allem um Monozyten und T-Lymphozyten handelt. Über eine Reihe von Rezeptoren phagozytieren Monozyten die oxidativ modifizierten LDL-Partikel und differenzieren insbesondere durch den Einfluss des macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) zu Makrophagen, die nach der Lipidaufnahme als Schaumzellen bezeichnet werden. Diese Zellen stellen das zelluläre Korrelat der frühen Formen der Atherosklerose dar, die als Fettstreifenläsionen oder im angloamerikanischen „fatty streaks“ bezeichnet werden. Fettstreifenläsionen finden sich bereits bei Kindern und Jugendlichen und sind zunächst nicht als pathologisch zu betrachten, sie können jedoch bei Fortschreiten der Läsion zur Ausbildung von relevanten Plaques führen.

T-Lymphozyten unterhalten die entzündliche Reaktion durch weitere Produktion von Zytokinen, diese wiederum stimulieren die Bildung von Wachstumsfaktoren, z.B. Platelet-derived growth factor (PDGF). Durch deren Einfluss kommt es zur Einwanderung von glatten Gefäßmuskelnzellen aus der Media in die Intima und deren Proliferation. Über autokrine und parakrine Mechanismen werden weitere Wachstumsfaktoren exprimiert und die Muskelzellen zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Kollagen) angeregt. Meist wächst diese Plaque zunächst extraluminal, sodass es über lange Zeit zu keiner relevanten Stenose kommt. Im fortgeschrittenen Stadium besteht diese Plaque aus einem lipidreichen Kern und einer fibrösen Hülle. Es kommt zur Neovaskularisation, d.h., entstandene Mikrogefäße versorgen die Plaque, indem sie die Leukozytenmigration unterhalten, was deren Wachstum fördert und zu Hämorrhagien innerhalb der Plaque führt. Durch Apoptose gehen Schaumzellen im Kern der Plaques zugrunde, es entsteht ein

nekrotischer Kern. Die fortschreitende Entzündungsreaktion führt zur Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche die Destruktion der extrazellulären Matrix induzieren, es resultiert eine instabile Plaque. Instabile Plaques sind hochgradig rupturgefährdet. Bei der Plaqueruptur wird Kollagen freigesetzt, dieses führt beim Kontakt mit den gerinnungsaktiven Kaskaden des Blutes zu deren Aktivierung. Thrombozyten setzen (wie auch Endothelzellen) den von-Willebrand-Faktor frei, welcher die erneute Thrombozytenaggregation vermittelt. Weiterhin wird über die rupturierte Plaque der Tissue factor (TF) freigesetzt, welcher zur Aktivierung des extrinsischen Weges der Gerinnungskaskade führt und so die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin vermittelt. Es entsteht ein Netz aus Fibrinfäden und Thrombozyten, ein weißer arterieller Thrombus entsteht, der akut zum teilweisen oder kompletten Gefäßverschluss führen kann und sich im Falle des Betreffens der Koronararterien als akutes Koronarsyndrom (ACS) manifestiert (10,12,13,14).

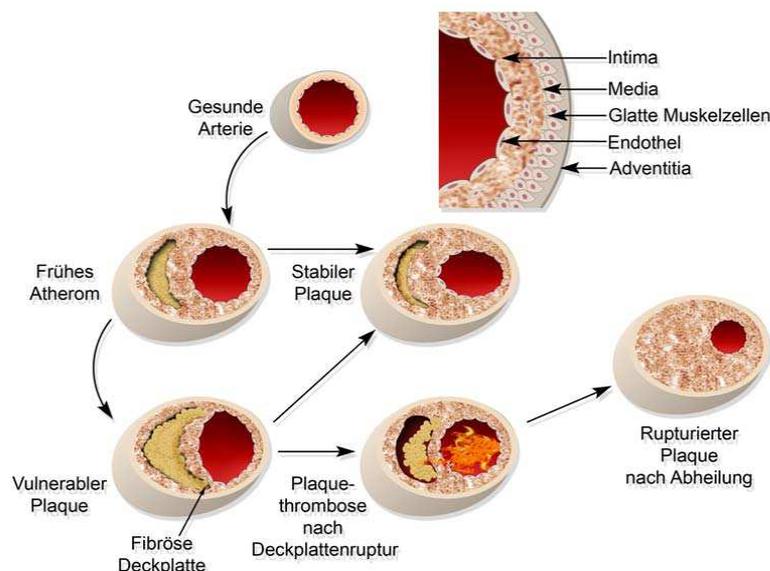


Abb. 3 Pathogenese der Atherosklerose (nach 15)

1.1.5 Manifestationsformen und Diagnostik der KHK

Grundsätzlich kann sich die Atherosklerose der Koronargefäße als chronisch stabile KHK oder als ACS äußern. In einigen Fällen stellt der plötzliche Herztod als weitere Subentität des ACS die Erstmanifestation einer KHK dar. Leitsymptom ist die Angina pectoris, retrosternal lokalisierte Schmerzen und Engegefühl mit Ausstrahlung linksthorakal, in den linken Arm, Hals, Unterkiefer oder Oberbauch.

Die chronische KHK ist gekennzeichnet durch eine langsam wachsende Gefäßstenose, die klinisch stumm sein kann oder durch eine stabile Angina pectoris-Symptomatik auffällig wird. Dies setzt voraus, dass die Symptomatik belastungsinduziert mit immer gleichem Schmerzcharakter auftritt

und gut auf die Gabe von Nitroglycerin anspricht. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es jedoch zu Komplikationen, wie dem Auftreten eines ACS, einer ischämischen Kardiomyopathie oder Herzrhythmusstörungen kommen. Sistieren die Beschwerden nicht spontan oder nach Nitroglyceringabe, tritt die Symptomatik in Ruhe oder erstmals auf oder zeigt veränderten und progredienten Schmerzcharakter, geht man von einem ACS aus. Der Verdacht auf eine chronische KHK kann durch eine ergometrische Untersuchung oder Myokardszintigrafie erhärtet und schließlich mittels Durchführung einer diagnostischen Koronarangiografie gesichert werden. Bei klinischem Verdacht auf ein ACS sollte innerhalb von zehn Minuten nach Beginn des Patientenkontaktes ein 12-Kanal-EKG aufgezeichnet werden und nach sechs Stunden und 24 Stunden bzw. bei anhaltender Symptomatik wiederholt werden. Die Anzahl der Ableitungen mit Ischämiezeichen im Sinne von ST-Streckensenkungen und deren Ausmaß korrelieren mit der Größe des Ischämieareals und der Prognose des Patienten. Zusätzlich sollte sofort nach Erstkontakt mit dem Patienten Blut zur Bestimmung ischämietypischer, kardialer Marker abgenommen werden. Der spezifischste und sensitivste Marker ist dabei das myokardiale Strukturprotein Troponin, welches innerhalb von drei bis vier Stunden nach Ischämiebeginn ansteigt und für circa zwei Wochen nachweisbar bleibt. Findet sich keine Erhöhung des Troponins, kann klinisch die Diagnose einer instabilen Angina pectoris gestellt werden. Bei Erhöhung des Troponins ohne ST-Streckenhebungen im 12-Kanal-EKG sprechen wir vom Nicht-ST-Hebungsmyokardinfarkt (Non-ST-elevation myocardial infarction = NSTEMI), bei Erhöhungen, die von ST-Streckenhebungen begleitet sind, von einem ST-Hebungsmyokardinfarkt (ST-elevation myocardial infarction = STEMI). Pathophysiologisch besteht der Unterschied zwischen STEMI und NSTEMI darin, dass es beim STEMI in der Regel zum vollständigen Gefäßverschluss durch den Thrombus kommt, während beim NSTEMI der Blutfluss meist eingeschränkt erhalten bleibt. Hier embolisieren Plaque und Thrombus in die nachfolgenden Gefäßabschnitte und führen so zu multiplen Mikroembolien/-ischämien (10,16).

1.1.6 Therapiemöglichkeiten

Wichtigster Grundpfeiler bei der Behandlung der chronischen KHK ist die Beseitigung von Risikofaktoren, dies beinhaltet eine Veränderung der Lebensgewohnheiten (Nikotinkarenz) und die optimale Behandlung von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und Dyslipoproteinämie. Die medikamentöse Therapie besteht unter anderem aus einer anti-ischämischen und anti-thrombotischen Komponente. Zur symptomatischen Behandlung bei Angina pectoris-Anfällen können organische Nitrate (Nitroglycerin oder Isosorbiddinitrat) verwendet werden. Betarezeptorenblocker senken den myokardialen Sauerstoffverbrauch und sind bei allen Postinfarktpatienten indiziert. Für sie ist eine Senkung der Mortalität belegt. Alternativ können Kalziumkanalblocker eingesetzt werden, wobei akut wirksame Dihydropyridine bei ACS und bis zu vier Wochen nach Myokardinfarkt nicht indiziert sind. Die antithrombotische Therapie mit ASS

oder einem P2Y₁₂-Inhibitor (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) ist ebenfalls mit einer deutlichen Mortalitätssenkung verbunden. Alle Patienten mit bestehender Linksherzinsuffizienz sowie Postinfarktpatienten sollten zusätzlich mit einem ACE-Hemmer (Angiotensin-converting-Enzym-Hemmer) oder Angiotensin-II-Rezeptor-I-Blocker (ARB) versorgt werden.

Ein weiteres anti-ischämisch wirkendes Medikament ist Ivabradin, ein I_f-Kanal-Hemmer, welches bei einer KHK überwiegend symptomatisch, bei systolischer Herzinsuffizienz auch prognostisch wirkt.

Allen Patienten mit KHK sollte die jährliche Gripeschutzimpfung empfohlen werden, auch hierfür ist eine Mortalitätssenkung belegt.

Ist medikamentös keine Beschwerdeverbesserung zu erreichen, sollte eine Revaskularisationstherapie in Betracht gezogen werden. Dies erfolgt meist als perkutane Koronarintervention (PCI) mit oder ohne Stentimplantation und ist bei Patienten mit Bifurkationsstenosen des Hauptstammes der linken Koronararterie sowie Patienten mit koronarer Dreifäßerkrankung Mittel der zweiten Wahl nach einer aortokoronaren Bypassoperation (ACB-OP). Dabei gibt es im Falle der Stentimplantation die Möglichkeit eines Bare-Metal-Stents (BMS) oder eines Drug-eluting-Stents (DES), welcher mit Immunsuppressiva (z.B. Sirolimus) oder Zytostatika (z.B. Paclitaxel) zur Reduktion der Restenoserate beschichtet ist. Da hier allerdings die Gefahr von In-Stent-Thrombosen auch nach vier Wochen auf Grund der verzögerten Endothelialisierung der Stentstruts hoch ist, muss eine duale Thrombozytenaggregationshemmung bestehend aus ASS und einem P2Y₁₂-Inhibitor für sechs bis zwölf Monate erfolgen.

Bei Patienten mit ACS wird ebenso anti-ischämisch mit Nitraten und Betarezeptorblockern sowie anti-thrombotisch mit ASS und einem P2Y₁₂-Inhibitor behandelt. Zusätzlich sollte die plasmatische Gerinnung mit niedermolekularen Heparinen, unfraktionierten Heparinen, Faktor-Xa- oder direkten Thrombininhibitoren gehemmt werden und eine optimale Schmerztherapie erfolgen. Bei Patienten mit niedrigem Risiko (kein Troponinnachweis, Beschwerdefreiheit, keine hämodynamische Instabilität) sollte ein nichtinvasiver Ischämienachweis erfolgen (z.B. Ergometrie, Myokardszintigrafie). Bei Hochrisiko-Patienten mit NSTEMI und instabiler Angina pectoris sollte innerhalb von zwei bis 72 Stunden eine Koronarangiografie erfolgen. Bei Patienten mit STEMI sollte der Zeitraum bis zum Beginn der PCI höchstens 90 Minuten ab Kontaktaufnahme mit dem Patienten betragen. Ist dies nicht möglich, sollte im Idealfall noch im Notarztwagen umgehend eine intravenöse Fibrinolysetherapie begonnen werden (17,18,19).

1.2 Das Endothel

1.2.1 Aufbau und Funktion des intakten Endothels

Die Arterienwand ist aus drei Schichten aufgebaut, von außen nach innen sind das Adventitia, Media und Intima. Die innerste Schicht, die Intima, besteht aus Endothelzellen, die durch eine

Basalmembran von den übrigen Schichten abgegrenzt sind, sowie dem subendothelialen Bindegewebe.

Das Endothel besteht aus polygonalen Zellen, die durch tight-junctions verbunden sind und ein einschichtiges, unverhornendes Plattenepithel bilden. Es trennt den Intravasalraum von den tieferen Wandschichten und erfüllt dort vielfältige Funktionen. Als Diffusionsbarriere verhindert es den Durchtritt von makromolekularen Bestandteilen in den subendothelialen Raum. Außerdem verhindert das intakte Endothel das Anheften von Leukozyten und Thrombozyten, da es ohne Aktivierung lumenwärts keine Adhäsionsmoleküle exprimiert.

Das gesunde Endothel besitzt fibrinolytische Eigenschaften, welche über verschiedene Mechanismen verwirklicht werden. Einerseits wirken die von den Endothelzellen gebildeten Mediatoren, Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin, der Thrombozytenaggregation entgegen, andererseits können Endothelzellen Thrombomodulin ausschütten, welches an Thrombin bindet und über eine Aktivierung des Protein-C-Signalweges Gerinnungsfaktoren verbraucht. Wichtiger in diesem Zusammenhang sind jedoch die Bildung von Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA) und die Exprimierung von Rezeptoren für intrazelluläre Plasminogenaktivatoren, welche die fibrinolytischen Eigenschaften des Endothels mit bedingen. Der in den Endothelzellen gebildete von-Willebrand-Faktor wird nur nach Gefäßverletzungen freigesetzt (20).

1.2.2 Die Rolle des Stickstoffmonoxids

Eine weitere Aufgabe des Endothels ist die Regulierung des Gefäßtonus. Dieser wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Der Ruhetonus wird bestimmt durch eine sympathikusvermittelte Vasokonstriktion und eine entgegengesetzt wirkende NO-vermittelte Vasodilatation (21).

Maßgeblich beteiligt an der Entdeckung des NO als bedeutender Mediator der Gefäßrelaxation ist Robert Francis Furchgott, ein US-amerikanischer Wissenschaftler, welcher seit dem Jahr 1978 an der Entdeckung des Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) forschte und dafür schließlich zusammen mit zwei weiteren Wissenschaftlern den Nobelpreis für Medizin erhielt. Erst später wurde bekannt, dass dieser EDRF identisch mit NO ist. Furchgott lieferte in den folgenden Jahren bedeutende Erkenntnisse zur Bedeutung des von ihm entdeckten Stoffes (22,23).

NO ist ein Gas, welches eine Halbwertszeit von nur sechs Sekunden besitzt und durch Hämoglobin oder reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert wird. Gebildet wird es in Endothelzellen durch die Aktivierung einer endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin. Die NO-Synthase wird durch eine intrazelluläre Steigerung der Calciumkonzentration aktiviert, wodurch die eNOS aus ihrer Bindung mit Caveolin entlassen wird und eine Bindung mit Calmodulin eingehen kann. Dieser enzymatische Schritt erleichtert die Oxidation von L-Arginin und damit die Produktion von NO. Dieses kann aus Endothelzellen in die benachbarten glatten Muskelzellen der Media diffundieren. Dort aktiviert es eine lösliche Guanylatzyklase, wodurch die Konzentration

des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) steigt. Dies hat zur Folge, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration in den glatten Muskelzellen sinkt. Es kommt zur Relaxation der Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation (21,23).

Wodurch kann die Bildung der eNOS aktiviert werden? Es gibt verschiedene Mediatoren, die über eine Signalkaskade zur Erhöhung der Calciumkonzentration führen. Dazu zählen zum Beispiel Bradykinin, Acetylcholin, Serotonin und Adenosin triphosphat (ATP). Weiterhin wurde von Furchgott et al. der Mechanismus der blutflussinduzierten Vasodilatation beschrieben. Durch eine blutflussinduzierte Schubspannung entsteht ein Scherstress, der eine Öffnung von dehnungssensitiven Kationenkanälen in den Endothelzellen induziert. Dadurch kann Calcium in die Zellen einströmen und die eNOS aktivieren (21,23).

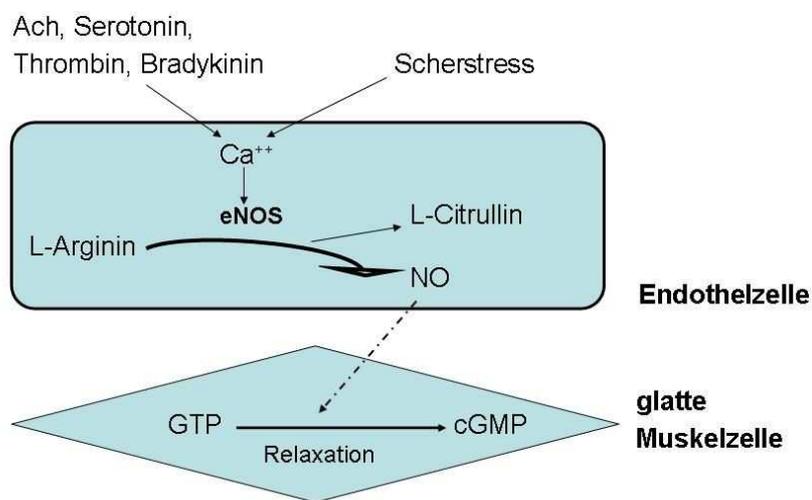


Abb. 4 Das L-Arginin-Stickstoffmonoxid-System (modifiziert nach 24)
 Ach = Acetylcholin, Ca^{++} = Calciumionen, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase,
 NO = Stickstoffmonoxid, GTP = Guanosin-Triphosphat, cGMP = cyclisches Guanosin-Monophosphat

Als direkte Vasodilatoren, d.h. ohne eine Erhöhung der NO-Konzentration, wirken zusätzlich der Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) und Prostacyclin.

Neben den vasodilatatorischen Eigenschaften beschrieb Furchgott weitere Eigenschaften des NO. Es inhibiert die Thrombozytenaggregation und die Leukozyteneinwanderung, indem es die Expression von vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), einem Adhäsionsmolekül für Leukozyten, vermindert. Außerdem vermindert es die Produktion des TF, welcher die Gerinnungskaskade aktiviert (22).

Dem entgegen werden von den Endothelzellen auch vasokonstriktorische Stoffe ausgeschüttet, dazu gehören Endothelin und Urotensin II. Der ebenfalls vom Endothel gebildete Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist bedeutend bei der Angiogenese (21).

1.2.3 Die endotheliale Dysfunktion

Viele Studien haben nachweisen können, dass die endotheliale Dysfunktion eines der ersten Ereignisse bei der Entstehung der Atherosklerose ist und einen prognostischen Wert hinsichtlich des Auftretens von kardiovaskulären Komplikationen besitzt (25,26,27). Kuvin et al. zeigte im Jahr 2001, dass die endotheliale Dysfunktion eine systemische Erkrankung ist, dass also bei einer bestehenden peripheren endothelialen Dysfunktion auf eine koronare Endotheldysfunktion geschlossen werden kann (25,26,27,28).

Im Mittelpunkt der endothelialen Dysfunktion steht die verminderte Bildung und Freisetzung von Stickstoffoxid. Dies wird vermutlich verursacht durch eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, die vor allem bei Anwesenheit von den bereits benannten kardiovaskulären Risikofaktoren entstehen.

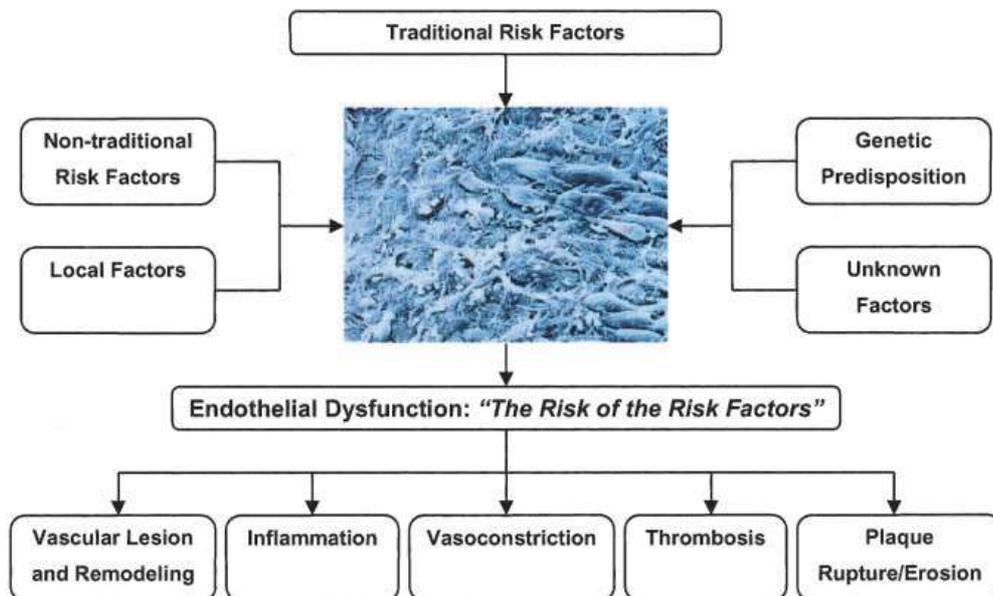


Abb. 5 Endotheliale Dysfunktion als „The risk of the risk factors“ (aus 29)

Freie Sauerstoffradikale entstehen im menschlichen Körper in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Atmungskette und stellen starke Oxidantien dar. Sie befinden sich im gesunden Organismus im Gleichgewicht mit anti-oxidativ wirkenden Stoffen. Durch das Einwirken von bestimmten Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen oder Dyslipoproteinämie kommt es zu einem Überwiegen der oxidativ wirkenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), man spricht von oxidativem Stress. Diese Sauerstoffradikale reagieren mit NO zu Peroxynitrit, wodurch NO verbraucht wird und der Endothelzelle nicht mehr zur Verfügung steht.



Abb. 6 Reaktionsgleichung zur Entstehung von Peroxynitrit

Peroxynitrit seinerseits reagiert weiter und bildet andere ROS, welche wiederum starke Oxidantien darstellen. Auch Lipide können mit ROS reagieren, wobei Lipidperoxyradikale entstehen, dieser Vorgang wird Lipidperoxidation genannt. Weiterhin werden durch das Überwiegen der Oxidantien oxidierte LDL-Partikel gebildet. Das oxidierte LDL ist direkt an der Entstehung der „fatty streaks“ und damit der Atherosklerose beteiligt, es inaktiviert NO direkt sowie indirekt durch Inaktivierung von eNOS. Im Gegenzug stimuliert es die Endothelin-Produktion, welche zur Vasokonstriktion führen kann. Die Oxidation von Phospholipiden des LDL führt zusätzlich zur Anreicherung von Lysophosphatidylcholin, welches die Freisetzung von Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1) fördert und gleichzeitig die von t-PA hemmt. Dies erklärt die anti-fibrinolytische Wirkung der ROS auf das Endothel. Oxidiertes LDL regt die Endothelzellen zur Produktion von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1 u.a.) und Chemokinen an, es fördert die Bildung von NF-κB, einem Transkriptionsfaktor, der die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verstärkt (30,31,32). Die endotheliale Dysfunktion geht mit einem Verlust der anti-koagulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften des Gefäßendothels einher, vorrangig verursacht durch die verminderte Bioverfügbarkeit von NO. Die Fähigkeit zur Vasodilatation ist eingeschränkt und die Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten, vorrangig Monozyten und T-Lymphozyten wird gefördert. Durch die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF-κB werden vermehrt proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Diese inflammatorische Reaktion spielt eine entscheidende Rolle beim Vorgang des Gefäßremodelings und erhöht die Rupturgefahr der Plaques (durch die Aktivierung von Kollagenasen) (33,34).

1.3 Messung der Endothelfunktion

1.3.1 Invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion

Die ersten Erkenntnisse zur endothelialen Dysfunktion wurden unter anderem 1980 von Furchgott publiziert. Ein zentraler Versuchsaufbau zur Untersuchung der Fragestellung war die Applikation von Acetylcholin (Ach) in die thorakale Aorta von Kaninchen. Dabei stellte er fest, dass es durch Ach zu einer Vasodilatation im jeweiligen Gefäßsegment kommt, da dadurch die NO-Ausschüttung stimuliert wird (35). In zahlreichen weiteren Studien wurde die Rolle der endothelialen Dysfunktion der Koronararterien bei der KHK untersucht. So wurde festgestellt, dass es bei Patienten mit gesicherter Koronarstenose als Reaktion auf die intrakoronare Applikation von Ach zu einer paradoxen Vasokonstriktion kommt (36). Diese Methode zur Messung der endothelialen Dysfunktion setzt jedoch einen koronarangiografischen Eingriff voraus.

1.3.2 Nichtinvasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion

Eine weniger aufwendige Methode zur Untersuchung der Endothelfunktion stellt die Messung der „flow mediated dilation“ (FMD) mittels Sonografie der größeren peripheren Arterien, z.B. der Art. brachialis oder der Art. femoralis, dar. Dies beruht auf der Annahme, dass es bei Veränderungen im Blutfluss zu einer durch Scherstress induzierten Vasodilatation kommt. Durch die auf die Endothelzelle einwirkenden Scherkräfte werden Kalium-Kanäle geöffnet, die Zelle wird hyperpolarisiert und Kalzium strömt ein. Hierdurch wird die eNOS aktiviert und die Bioverfügbarkeit von NO steigt. Die FMD wird in Prozent als Vergrößerung des Gefäßdurchmessers zum Ausgangsdurchmesser angegeben (37,38). Diese Methode wurde erstmals 1992 von Celermajer et al. beschrieben (39). Er zeigte damit, dass eine endotheliale Dysfunktion bereits bei Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie und bei jungen, erwachsenen Rauchern vorliegt (39). Im Jahr 1998 konnte ein Zusammenhang der peripheren und koronaren Endothelfunktion gezeigt werden, indem zur Untersuchung der gleiche Stimulus verwendet wurde, die Blutfluss-induzierte statt der Ach-vermittelten Vasodilatation. Dies wurde durch intrakoronare ATP-Infusion, die zu einer Beschleunigung des Blutflusses führt, nachgewiesen. Dieser Parameter korrelierte signifikant mit der sonografisch gemessenen FMD (40). In zahlreichen weiteren Studien wurde die Korrelation zwischen peripherer und koronarer Endothelfunktion diskutiert: Neunteufl et al. zeigten, dass die FMD mit der angiografisch nachgewiesenen Ausdehnung einer KHK korreliert (41) und Yeboah et al. (2007) zeigten eine Korrelation mit dem Auftreten von späteren kardiovaskulären Ereignissen (42). Erst 2011 wurde nachgewiesen, dass der Nachweis von Plaqueinstabilitäten mit der peripheren FMD korreliert. Die pathophysiologische Vorstellung beinhaltet hierbei, dass durch die endotheliale Dysfunktion und somit der geringeren Bioverfügbarkeit von NO die inflammatorische Reaktion perpetuiert wird (43).

1.3.3 Sonografische Messung der FMD

Zur Messung der FMD an der A. brachialis wird ein hochauflösender Ultraschall verwendet; 10-13 MHz sind nötig, um die Intima-Lumen-Grenze (I-Linie) darstellen zu können. Nach einer mindestens zehnminütigen Ruhephase des Patienten wird die Gefäßweite über der Ellenbeuge im B-Mode-Bild aufgezeichnet. Als Ausgangsdurchmesser zählt dabei das Mittel von vier Messungen. Nach einer Drosselung des Blutflusses mittels einer auf suprasystolische Werte inflatierten Blutdruckmanschette für 4,5 Minuten kommt es nach Deflation der Manschette zu einer reaktiven Hyperämie, d.h. zu einer endothel-abhängigen Vasodilatation. Diese wird alle 10-15 Sekunden für mindestens zwei Minuten gemessen. Nach Erreichen des Ausgangswertes wird dem Patienten 0,4 mg Nitroglycerin sublingual verabreicht und die Gefäßweite nach drei Minuten bis zu deren Rückgang aufgezeichnet. Damit wird die endothel-unabhängige Vasodilatation gemessen.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die FMD: die Tageszeit, die Temperatur, Medikamente, der Verzehr von Kaffee und Tee, bestimmten Speisen sowie der Menstruationszyklus. Weiterhin

beeinflusst der Ausgangsdurchmesser der zu messenden Arterie das Ergebnis, bei kleinem Durchmesser ist die FMD höher als bei großem Durchmesser (Gefäßweiten unter 2,5 mm und über 5 mm sollten Ausschlusskriterien darstellen) (44).

1.3.4 Reactive Hyperemia by Peripheral Arterial Tonometry (RH-PAT)

Eine weitere Methode zur Messung der Endothelfunktion ist die Aufzeichnung der Pulswellentonometrie an den kleinen Fingerarterien mithilfe eines plethysmografischen Systems (RH-PAT). Auch hier wird das Prinzip der reaktiven Hyperämie und der anschließenden Scherstress-induzierten Vasodilatation genutzt, indem in gleicher Weise wie beim Brachialis-Ultraschall eine fünfminütige Stauung angelegt und nach Lösen der Stauung für weitere fünf Minuten eine arterielle Pulsamplitude aufgezeichnet wird, welche die Volumen- und Tonusveränderungen im Gefäß widerspiegelt (45,46). Die Ergebnisse der RH-PAT-Indizes korrelierten dabei signifikant mit den Werten des Brachialis-Ultraschalls, ebenso konnte eine Korrelation mit dem Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden (47).

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass sie einfach und schnell durchzuführen ist. Die Analyse der Pulsamplituden erfolgt software-basiert und ist somit weitaus weniger vom Untersucher abhängig als die Brachialis-Ultraschall-Methode (48). Nachteile der Methode sind die Kosten sowie der apparative Aufwand.

Bonetti et al. überprüften 2004 den Zusammenhang zwischen PAT-Index und koronarer endothelialer Dysfunktion. Hierbei war nach intrakoronarer Ach-Applikation das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion als eine Dilatation um weniger als 50% definiert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Gefäßantwort auf die Gabe von Ach mit dem peripher gemessenen RH-PAT-Index. Durch die Gabe von L-Nitro-Arginine-Methylester (L-NAME), einem Inhibitor der eNOS, sinkt die Bioverfügbarkeit von NO und ein Fallen des PAT-Index konnte erreicht werden. Dies beweist, dass die gemessenen Tonusveränderungen NO-abhängig sind und nicht auf Reaktionen des vegetativen Nervensystems beruhen (49).

In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurde der Zusammenhang des PAT-Wertes mit kardiovaskulären Risikofaktoren an Patienten der dritten Generation der Framingham-Studienteilnehmer untersucht. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation mit männlichem Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und Hypercholesterinämie. Überraschenderweise zeigte sich eine negative Korrelation mit dem Lebensalter, keine Korrelation fand sich zum systolischen Blutdruck sowie zum CRP (50). Haller et al. zeigten 2007, dass bereits Kinder mit Typ 1 Diabetes mellitus veränderte PAT-Werte aufweisen (51). Nicht zuletzt wurde in einer Studie von 2010 bestätigt, dass sich die RH-PAT-Methode vor allem bei Frauen zur Identifikation von Hochrisikopatientinnen noch vor Krankheitsmanifestation eignet (52).

1.4 Die Rolle der CD14+CD16+-Monozyten

1.4.1 Monozyten und deren Subpopulationen

Monozyten sind zu den Leukozyten gehörige Zellen, die einen großen, meist nierenförmig gebogenen Zellkern besitzen und einen Durchmesser von etwa 12-20 µm haben. Sie zeichnen sich durch ihre besondere Fähigkeit zur Migration und Phagozytose aus und sind somit essentieller Bestandteil der unspezifischen Abwehr. Sie werden im Knochenmark sezerniert und ins Blut freigesetzt. Durch verschiedene Aktivierungswege wandern Monozyten in Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen, Osteoklasten (Knochen) oder Kupfferschen Sternzellen (Leber). Sie gehören damit zum mononukleären Phagozytensystem (MPS). Weiterhin besitzen sie MHC-II-Moleküle zur Antigenpräsentation, sind zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen befähigt und können B- und T-Lymphozyten aktivieren. Damit besitzen Monozyten Aufgaben bei der spezifischen Abwehr und der Tumorabwehr (53,54). Im Jahr 1989 wurden von Passlick et al. Subpopulationen der Monozyten definiert. Der größte Teil aller Monozyten exprimiert CD14, einen Lipopolysaccharid(LPS)-Rezeptor. LPS ist Bestandteil der Wand von gramnegativen Bakterien. Nur ein kleiner Teil der im Blut nachweisbaren Monozyten exprimiert zusätzlich CD16 an ihrer Oberfläche. CD16 ist ein Fc-Rezeptor für Immunglobulin III. Anhand dieser Oberflächenmoleküle lassen sich die Monozyten einteilen in CD14++CD16-Monozyten und CD14+CD16+Monozyten (55).

1.4.2 Rolle der CD16+ Monozyten als pro-inflammatorische Zellen

Im Vergleich zu den CD14+CD16-Monozyten weisen CD14+CD16+Monozyten eine signifikant höhere Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen auf, dazu gehören insbesondere TNF- α , IL-6 und IL-1, während anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 im Regelfall nicht gebildet werden. Diese wiederum triggern die Differenzierung CD16-negativer in CD16-positive Monozyten (56,57). In den vergangenen Jahren konnten erhöhte Level von CD14+CD16+Monozyten bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden, so z.B. bei Autoimmunerkrankungen, wie die Kawasaki-Erkrankung und die Rheumatoide Arthritis, bei chronischen Infektionen, wie HIV und Tuberkulose, und bei zahlreichen weiteren Erkrankungen, wie Asthma, Sarkoidose und der atopischen Dermatitis. Die höchsten Werte werden bei akuten bakteriellen Infektionen, v.a. mit gramnegativen Bakterien, und bei Sepsispatienten gefunden. Auch bei bestimmten Tumorerkrankungen und Dialysepatienten konnten erhöhte Werte nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei Behandlung mit Glukokortikoiden ein Abfall der CD14+CD16+Monozyten (58,59,60,61,62).

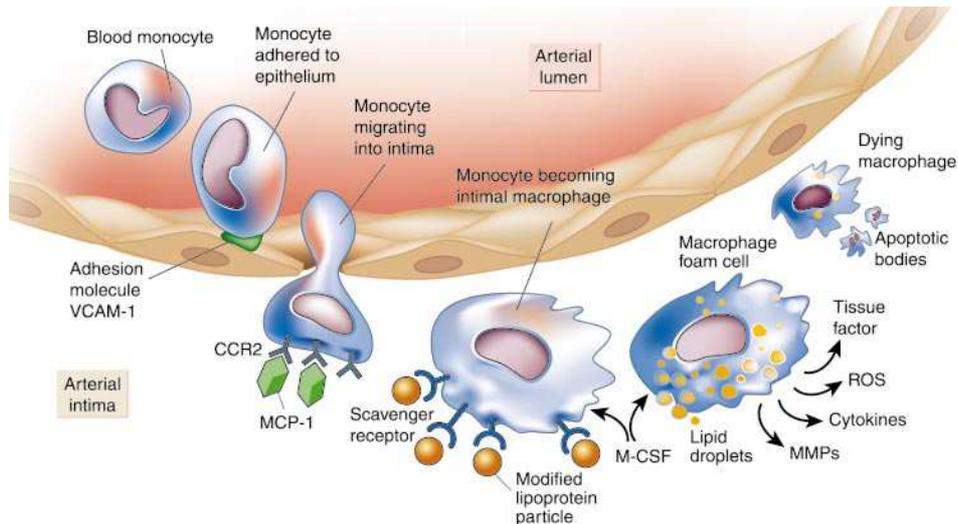


Abb. 7 Die Rolle der Monozyten in der Pathogenese der Atherosklerose (aus 63)

ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, VCAM = vascular cell adhesion molecule, M-CSF = macrophage colony-stimulating factor, CCR2 = Chemokine-(CC-motif)-Receptor, MCP-1 = Monocyte-Chemoattractant-Protein-1, MMPs = Matrixmetalloproteinasen

1.4.3 CD16+ Monozyten bei der Entstehung der Atherosklerose

Als erster Schritt bei der Entwicklung einer Atherosklerose wurde die endotheliale Dysfunktion beschrieben, bei welcher es zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) und Chemokinen auf den Endothelzellen kommt. Dadurch werden Monozyten rekrutiert, diese können an die Endothelzellen binden und oxidierte LDL-Partikel aufnehmen, sie werden zu Schaumzellen. CD14+CD16+Monozyten besitzen im Vergleich zu den klassischen Monozyten mehr VLA-4, ein Ligand des VCAM-1 und besitzen damit eine höhere Affinität zur Bindung an Endothelzellen (64). Weiterhin wird CX3CR1, ein Rezeptor des FKN (Fractalkine), welches ein membrangebundenes Glykoprotein mit einer Chemokindomäne darstellt, vermehrt exprimiert. Somit werden bevorzugt CD14+CD16+Monozyten zum Ort der atherosklerotischen Läsion rekrutiert. In einer Arbeit mit 200 Patienten mit gesicherter KHK konnte im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe nachgewiesen werden, dass signifikant höhere prozentuale Werte der CD14+CD16+Monozyten und der damit korrelierenden TNF- α -Spiegel bei Patienten vorlagen (65).

2. Zielstellung

Es gilt als gesichert, dass bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung der Anteil der CD14+CD16+Monozyten im Vergleich zu den klassischen Monozyten erhöht ist. Als proinflammatorische Subpopulation vermitteln sie die Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren und könnten auf diesem Weg eine Schädigung des Endothels begünstigen. Da die endotheliale Dysfunktion eines der ersten Ereignisse bei der Entstehung der Atherosklerose darstellt und vor allem durch diese Entzündungsreaktion unterhalten wird, wurde von der Annahme ausgegangen, dass diese durch die vermehrte Anwesenheit von CD14+CD16+Monozyten initiiert und gefördert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer prospektiven Studie bei koronar Herzkranken und Patienten, bei denen keine atherosklerotische Krankheit bekannt war, zu untersuchen, ob eine Störung der endothelialen Funktion (gemessen mit dem Verfahren des RH-PAT) mit einem erhöhten Anteil der proinflammatorischen CD16+ Monozyten assoziiert ist.

3. Material und Methoden

3.1. Studienpopulation

Für die vorliegende Subanalyse der PHAMOS-Studie (**P**rospective **H**alle **M**onocyte **S**tudy) wurden 120 Patienten im Zeitraum von Juni 2007 bis Juli 2010 untersucht, wovon 80 Patienten der Fallgruppe und 40 Patienten der Kontrollgruppe angehörten. Da bei 13 Patienten (ein Patient der Verum-, zwölf der Kontrollgruppe) aus methodischen Gründen die Analyse der Monozyten nicht valide möglich war, blieben diese bei der Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich der Monozyten-Subpopulationen unberücksichtigt.

Die PHAMOS-Studie rekrutierte prospektiv insgesamt 1.000 Patienten mit Koronarer Herzerkrankung, die zur stationären Behandlung in den Jahren 2007-2009 am Universitätsklinikum Halle (UKH) behandelt worden waren. Einschlusskriterium für die Fallgruppe war die in einer aktuellen oder einer vorherigen Herzkatheteruntersuchung koronarangiografisch gesicherte KHK. Patienten und Probanden wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit starker gesundheitlicher Beeinträchtigung, zum Beispiel aufgrund einer Demenz oder schwerwiegender Grunderkrankungen, wie etwa Krebserkrankungen. Patienten ohne Einwilligung und solche, die unfähig waren, die Aufklärung zu verstehen bzw. zu unterschreiben, wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Für die Kontrollgruppe galten als Ausschlusskriterien das Vorliegen einer KHK oder Koronarsklerose sowie eine aktive Krebs- oder Infektionserkrankung. Auch hier bedurfte es eines schriftlichen Einverständnisses.

Es wurden alle konsekutiven Patienten eingeschlossen, die im genannten Zeitraum im Department für Innere Medizin oder der Klinik und Poliklinik für Herz-Thorax-Chirurgie stationär aufgenommen worden waren und die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten. Die Patienten der Kontrollgruppe wurden von der kardiologischen, ophthalmologischen und urologischen Station des UKH sowie über die Hausarztpraxis von Frau Dr. Schnell in Bad Dürrenberg rekrutiert.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg geprüft und zustimmend bewertet.

3.2. Datenerhebung

Vor Einschluss in die Studie waren alle Patienten mündlich und schriftlich anhand eines Aufklärungsbogens über Ablauf und Ziel der Studie aufgeklärt worden. Nach Erhalt des schriftlichen Einverständnisses waren anhand eines standardisierten Fragebogens die studienrelevanten Daten erfasst und anschließend in eine dafür eingerichtete Datenbank des Programms Microsoft Excel® eingegeben worden.

3.2.1. Anamnestische Angaben

Hierzu gehörten zunächst Geburtsdatum sowie Größe und Gewicht. Bei der Erhebung der kardiovaskulären Risikofaktoren wurden folgende Angaben berücksichtigt: Aktives Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie, pAVK und eine positive Familienanamnese.

Aus den Angaben zu Größe und Gewicht wurde der Body-Mass-Index (BMI) bestimmt, indem der Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körperlänge in Metern errechnet wurde. Dabei ist ein Wert zwischen 18,5 und 25 kg/m² als normal anzusehen, ein Wert zwischen 25 und 30 kg/m² entspricht der Definition des Übergewichtes und ab einem Wert von 30 kg/m² spricht man von Fettleibigkeit (Adipositas). Es wurde außerdem die Waist-Hip-Ratio (WHR) als Quotient aus dem Taillenumfang und dem Hüftumfang in Zentimetern errechnet. Ein Wert von <0,8 bei Frauen und <0,9 bei Männern ist dabei als normal zu betrachten, höhere Werte sprechen für eine bauchbetonte, „viszerale“ Adipositas, die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht (66; 67).

Als Raucher wurden alle Patienten angesehen, die bis drei Tage vor Studieneinschluss aktiv rauchten.

Von einem Diabetes mellitus wurde gesprochen, wenn zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses eine diätische oder medikamentöse antidiabetische Therapie bestand oder ein Nüchternblutzucker von >7 mmol/l im Rahmen des stationären Aufenthaltes gemessen wurde.

Eine arterielle Hypertonie wurde angenommen, wenn diese bekannt war oder der Patient zum Aufnahmezeitpunkt eine entsprechende Medikation erhielt bzw. ein Blutdruck von >140/90 mmHg nach Riva Rocci während des stationären Aufenthaltes gemessen wurde.

Eine Dyslipoproteinämie wurde diagnostiziert, wenn diese bekannt war, der Patient eine entsprechende Medikation erhielt oder ein Nüchterncholesterinwert von >5,2 mmol/l bzw. ein LDL-Cholesterin von >3,9 mmol/l gemessen wurde.

Als positive Familienanamnese wurde die Manifestation einer KHK (u.a. akuter Herzinfarkt, plötzlicher Herztod) bei Verwandten ersten Grades vor dem 65. Lebensjahr angesehen.

Die Diagnose einer pAVK wurde dann gestellt, wenn diese sonografisch durch Messung des Ankle-Brachial-Pressure-Index (ABPI<0,9) nachgewiesen werden konnte oder bereits bekannt war. Dabei wurde dieser für alle vier Extremitäten bestimmt und der kleinste errechnete Wert als relevant angesehen. Patienten, bei denen ein ABPI-Wert von über 1,3 ermittelt wurde, blieben bei dessen Auswertung wegen des Verdachts auf Vorliegen einer Mediasklerose unberücksichtigt.

Weiterhin wurden Ereignisse, wie das Vorliegen eines früheren Myokardinfarkts, die Durchführung einer PCI oder einer ACB-OP, erfragt. Außerdem wurde ein vorangegangener Schlaganfall oder eine transitorisch ischämische Attacke (TIA) und das Vorliegen einer Arteria carotis-Stenose erfasst, wenn dies aus der Anamnese hervorging.

3.2.2. Laborparameter

Im Rahmen des Routineaufnahmelabors erfolgte bei jedem Patienten eine morgendliche Blutentnahme aus einer peripheren Vene. Diese Parameter wurden nach den Standardverfahren des Zentrallabors des UKH untersucht und anschließend ebenfalls in die Datenbank übertragen. Im Folgenden soll auf die untersuchten Parameter und die Bestimmungsmodalitäten eingegangen werden.

Kreatinin und Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Kreatinin entsteht im Muskelgewebe aus Kreatin und wird in der Niere vollständig glomerulär filtriert. Da es nicht tubulär rückresorbiert wird, kann seine Konzentration im Blut als Marker zur Bestimmung der Nierenfunktion verwendet werden. Es wird im Zentrallabor des UKH mit der Methode nach Jaffe bestimmt. Dabei bildet es mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung einen orange-roten Farbkomplex, dessen Extinktionszunahme zwischen 19 und 25 Sekunden bei 520 nm photometrisch gemessen werden kann und direkt proportional zur Kreatininkonzentration im Serum ist (68). Aus der Kreatininkonzentration im Serum wird die GFR mit der Formel nach Cockcroft-Gault berechnet.

$$\text{C-Krea (ml/min)} = \frac{(140 - \text{Alter [a]}) \times \text{KG [kg]}}{0,815 \times \text{S-Krea } [\mu\text{mol/l}]} \quad (\times 0,85 \text{ bei Frauen})$$

Harnstoff

Ebenfalls zur Beurteilung der Nierenfunktion eignet sich Harnstoff, welcher glomerulär filtriert und teilweise tubulär wieder absorbiert wird. Seine Serum-Konzentration ist von weiteren Faktoren, wie der Diurese und dem Proteinabbau, abhängig. Er ist ein Stoffwechselprodukt des Harnstoffzyklus und wird in den Mitochondrien der Leber gebildet. Bestimmt wird die Konzentration im Serum mit der kinetisch enzymatischen Leitfähigkeitsmethode (Potentiometrie). Dabei wird Harnstoff zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid hydrolysiert, diese Reaktion wird durch das Enzym Urease katalysiert. Es entstehen dabei Ammoniumionen, deren elektrisches Potential an einer Messelektrode bestimmt werden kann. Aus der gemessenen Leitfähigkeit kann somit auf die Menge der vorhandenen Ionen und damit auf die Konzentration des Harnstoffs geschlossen werden.

Gesamtcholesterin

Cholesterin dient im Organismus als Bestandteil von Zellmembranen und ist Vorstufe von Gallensäuren und Steroidhormonen. Es liegt zum größten Teil als Ester vor und wird im Blut überwiegend über LDL- oder HDL-Partikel transportiert. Zu 60% wird es endogen in Leber und Darm produziert, der Rest wird über die Nahrung zugeführt. Bei der Bestimmung wird Cholesterin im ersten Schritt enzymatisch durch eine Cholinesterase gespalten, wobei freies Cholesterin und Fettsäuren entstehen. Das freie Cholesterin wird nun durch eine Cholinoxidase oxidiert, dabei entsteht Wasserstoffperoxid und Cholesten-3-on. Das entstandene Wasserstoffperoxid reagiert anschließend mit Phenol und 4-Aminophenazon zu Chinonimin, einem roten Farbstoff („Trinder-Reaktion“), dessen Extinktionsänderung bei 520 nm gemessen wird und proportional zur Cholesterinkonzentration im Serum ist (69).

Triglyceride (TG)

Auch TG werden sowohl endogen produziert als auch mit der Nahrung aufgenommen, wobei die exogen zugeführten TG nach etwa zwei Stunden aus dem Blut verschwunden sind. Im ersten Schritt werden sie durch eine Lipase hydrolysiert, es entsteht freies Glycerin, welches durch eine Kinase zu α -Glycerophosphat reagiert. Der nächste Schritt ist die Umwandlung zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid durch eine entsprechende Oxidase. Analog zur Bestimmung des Gesamtcholesterins entsteht dann mit 4-Aminophenazon und Phenol der rote Farbstoff Chinonimin, dessen Extinktionsänderung photometrisch gemessen werden kann (69).

High Density Lipoprotein (HDL)

HDL-Partikel transportieren Cholesterin aus den Zellen ab und führen es der Leber zu, es hat eine überwiegend anti-atherogene Wirkung. Bei der Bestimmung bedient man sich eines homogenen Tests, der den Cholesterin-Anteil in den Partikeln misst. Hierbei wird ein Detergens verwendet, welches an die Membran der Apolipoprotein-B-haltigen LDL, VLDL und Chylomikronen bindet und so deren Reaktion mit den nachfolgenden Enzymen verhindert. Außerdem löst dieses Detergens das HDL-Cholesterin, sodass ausschließlich das Cholesterin der HDL-Partikel gemessen wird. Der weitere Ablauf gleicht dem der Bestimmung des Gesamtcholesterins. Unter Verwendung einer Esterase und einer Oxidase entsteht Wasserstoffperoxid, welches in einen Farbstoff umgewandelt wird und anschließend photometrisch gemessen wird. Die Extinktionsänderung bei 560 nm ist hierbei proportional zum HDL-Cholesterin im Serum.

Low Density Lipoprotein (LDL)

Analog zum HDL-Cholesterin wird auch das LDL-Cholesterin im homogenen Test direkt gemessen, indem zwei Detergenzien verwendet werden. Das erste Detergens löst alle Nicht-LDL-Partikel. Das aus ihnen freigesetzte Cholesterin reagiert wie bei der üblichen Cholesterinmessung

mit Cholesterinesterase und Cholestersinoxidase, jedoch ohne dabei ein Farbprodukt zu erzeugen. Mit dem Zusatz des zweiten Detergens werden die LDL-Partikel an einen chromogenen Kuppler gebunden. So kann die LDL-Konzentration photometrisch bestimmt werden, indem die Extinktionsänderung bei 560 nm gemessen wird.

CRP

Das CRP ist ein Akut-Phase-Protein, welches in der Leber durch IL-6 aktiviert wird. Es bindet an Bakterienmembranen und induziert eine Komplementreaktion. Bei akuten Entzündungsreaktionen zeigt es einen relativ schnellen Anstieg, sodass es große Bedeutung als Entzündungsmarker besitzt und auch zu deren Verlaufsbeobachtung dient. Es ist allerdings sehr unspezifisch. Gemessen wird es durch ein immunturbidimetrisches Verfahren, dabei reagiert das CRP mit einem monoklonalen Antikörper zu einem unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex. Die anschließende Turbidimetrie findet in einem Absorptionsphotometer statt. Eine Primärstrahlung trifft auf die in Lösung befindlichen Moleküle, welche einen anderen Brechungsindex als die Lösung selbst aufweisen, somit entsteht Streulicht. Gemessen wird nun, wie stark der Primärstrahl nach Durchdringen der Küvette durch die Streuung geschwächt ist. Diese Extinktionsänderung wird bei 340 nm gemessen und ist proportional zur CRP-Konzentration im Serum.

BNP (brain natriuretic peptide)

Das BNP ist ein natriuretisches Peptid, welches vorwiegend in den Zellen des Ventrikelmyokards, aber auch des Vorhofmyokards gebildet und ausgeschüttet wird. Beim Gesunden regelt es den Natriumhaushalt und damit den Blutdruck. Es wird vor allem zum Nachweis oder zur Prognoseabschätzung einer Herzinsuffizienz herangezogen. Die Bestimmung erfolgt durch ein Chemolumineszenzverfahren, bei dem das BNP mit einer Substanz gekoppelt wird, die durch chemische Oxidation Energie in Form von Photonen und damit Licht freisetzt. Diese können photometrisch gemessen werden.

Albumin

Albumin ist ein Plasmaprotein, welches in der Leber gebildet wird und vor allem die Transportfunktion für hydrophobe Substanzen im Blut übernimmt, aber auch zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks notwendig ist. Es dient der Diagnostik von Leber- und Nierenerkrankungen. Bei der Bestimmung wird der Farbstoff Bromkresolpurpur an das Albumin gebunden, das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffs verschiebt sich gegen das des ungebundenen Farbstoffs und kann photometrisch gemessen werden (68).

Hämoglobin

Hämoglobin wird auch als roter Blutfarbstoff bezeichnet, es ist für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich und fungiert außerdem als Puffersystem. Im Zentrum enthält es ein zweiwertiges Eisenatom. Nach Zugabe von SLS (Sodiumlaurylsulfat) binden sich die hydrophoben Anteile dieses Stoffes an das Globin und bewirken so eine Konformitätsänderung. Bei diesem Schritt entsteht Hämoglobin, welches dreiwertiges Eisen enthält. Nun kann sich der hydrophile Teil des SLS binden, dieser Komplex wird photometrisch bei 555 nm gemessen.

Differentialblutbild

Bei der Untersuchung des Differentialblutbildes werden die Leukozyten in ihre einzelnen Subpopulationen aufgeteilt. Man kann so Hinweise auf die Art einer Infektion, das Vorliegen einer Allergie oder malignen Erkrankung des Blutes erlangen. In der vorliegenden Studie wurde die Gesamtzahl der Monozyten dazu verwendet, den prozentualen Anteil der Subpopulationen der Monozyten zu berechnen. Bei der Analyse des Differentialblutbildes bedient man sich der Durchflusszytometrie. Hierbei werden alle Zellen hintereinander aufgereiht und an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Das entstehende Streulicht gibt Informationen über Größe und Granularität der Zellen, sodass eine Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen möglich ist. Im Zentrallabor des UKH werden die einzelnen Zellpopulationen als relativer Anteil an den Gesamtleukozyten angegeben; für die vorliegende Studie wurden alle Werte in absolute Angaben umgerechnet.

Fibrinogen

Fibrinogen ist ebenfalls ein Akute-Phase-Protein, das in der Leber gebildet wird. Vor allem besitzt es auch Bedeutung bei der Blutgerinnung. Es ist außerdem ein Risiko- und Prognosefaktor bei der Entstehung der Atherosklerose. Bestimmt wird es im Zentrallabor des UKH mit der koagulometrischen Methode nach Clauss, wobei die Citrat-Plasmaprobe stark verdünnt und anschließend mithilfe einer Thrombinlösung der Gerinnungsprozess aktiviert wird. Die Zeit bis zum Auftreten eines Fibringerinnsels wird gemessen, diese ist aufgrund der starken Verdünnung ausschließlich von der Fibrinogenkonzentration abhängig (69).

INR und PTT

Mit der koagulometrischen Methode wurden Thromboplastinzeit als INR (International Normalized Ratio) und die partielle Thromboplastinzeit bestimmt. Mit der INR wird der exogene Aktivierungsweg des Gerinnungssystems und mit der PTT der endogene Aktivierungsweg geprüft. Zum Citratplasma werden Gewebsthromboplastin (INR) bzw. partielles Thromboplastin (PTT) und Kalziumionen gegeben, anschließend wird im Koagulometer die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels gemessen (68).

Albumin und Kreatinin im Urin

Analog zu deren Bestimmung im Serum wurde zusätzlich das Albumin und Kreatinin aus dem Spontanurin bestimmt, um daraus einen Quotienten zu bestimmen. Dieser stellt nach aktueller Literatur einen geeigneten Parameter zur Abschätzung der Endothelfunktion dar und korreliert mit dem kardiovaskulärem Risiko (81, 82).

3.2.3 Durchführung der Koronarangiografie

Der koronarangiografische Nachweis einer koronaren Herzerkrankung war Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie. Die Indikation dazu wurde bei stabiler Angina pectoris-Symptomatik und akutem Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, NSTEMI, STEMI) gestellt. Bei der Herzkatheteruntersuchung wird in Lokalanästhesie eine arterielle Punktion der Art. femoralis, Art. radialis, Art. ulnaris oder Arteria brachialis vorgenommen. Über die punktierte Arterie wird eine Punktionskanüle vorgeschoben und in Seldinger-Technik über diese Kanüle ein Führungsdraht eingebracht und die Kanüle zurückgezogen. Anschließend wird über den Führungsdraht eine Schleuse eingeführt und über diese Schleuse der Katheter bis zu den Ostien der Koronargefäße vorgeschoben. Nach lokaler Applikation von 5-10 ml Röntgenkontrastmittel kann mittels Bildwandlerkontrolle nun die linke und rechte Koronararterie sowie vorhandene Bypassgefäße in verschiedenen Ebenen dargestellt und beurteilt werden. Bei Bedarf kann weiterhin eine Laevokardiografie (Darstellung des linken Ventrikels) durchgeführt werden. Während der Untersuchung werden im Regelfall Antikoagulantien, wie z.B. unfraktioniertes Heparin in der Dosierung von ca. 30-50 IU pro kg Körpergewicht sowie Nitroglycerin oder Isosorbidnitrat, zur Gefäßdilatation appliziert. Immer wird während der Untersuchung kontinuierlich der arterielle Druck aufgezeichnet. Eine KHK wird definiert, wenn eine Stenose von >50% des Gefäßquerschnitts in einer der dominanten Koronargefäße vorliegt, wobei beachtet werden muss, dass der Gefäßquerschnitt keinesfalls mit dem Gefäßdurchmesser gleichgesetzt werden sollte, so dass eine 50%ige Stenose mit einer mindestens zu erwartenden 70%igen Lumenreduktion assoziiert ist.

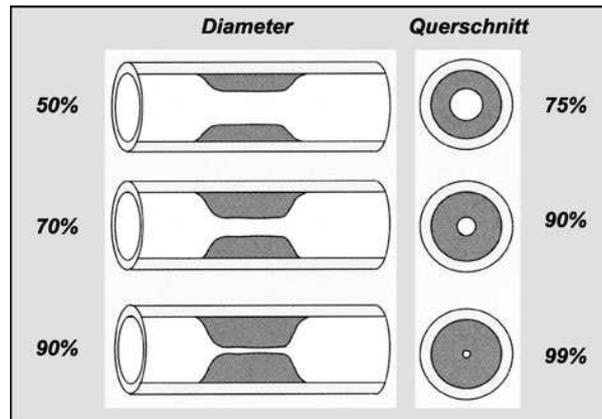


Abb. 8 Einschätzung des Stenosegrades. Vergleich der Verminderung von Durchmesser und Querschnitt (10)

In Abhängigkeit von Länge, Morphologie und Lage der Stenose kann bei entsprechender Indikation eine therapeutische Intervention angeschlossen werden, z.B. eine Ballondilatation mit und ohne Implantation eines Stents (70,71).

3.3. Bestimmung der CD14+CD16+-Monozyten

3.3.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen des täglichen Stationsablaufs morgens aus einer peripheren Vene. Dabei wurde neben den unter 3.2.2 aufgeführten Routineparametern eine weitere EDTA-Monovette zur Bestimmung der Subpopulationen der Monozyten abgenommen, welche schnellstmöglich durchgeführt wurde.

Außerdem wurden zwei weitere Serummonovetten abgenommen, wobei das Serum nach Zentrifugieren bei 3000 rpm in Eppendorf-Gefäßen bei -70°C aufbewahrt wurde, um eine eventuelle spätere Bestimmung anderer klinischer Parameter durchführen zu können.

3.3.2 CD14+CD16+-Oberflächenfärbung

Die Monozyten wurden anhand ihrer Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch analysiert und so ihre Subpopulationen untersucht. Voraussetzung dafür war, sie von anderen Zellen des Blutes zu trennen und anschließend mit monoklonalen Antikörpern zu markieren, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind.

Im ersten Schritt wurden aus einer Vollblutprobe in einer EDTA-Monovette 100 µl abpipettiert, diese mit zwei ml FACS-Puffer in einem fünf ml-FACS-Röhrchen gevortext und anschließend bei 1.300 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der FACS-Puffer wurde vorher aus bovinem Serumalbumin (2,5 mg BSA), Natriumazid (3,5 ml NaN₃ 10%), fetalem Kälberserum (25 ml FCS) und phosphatgepufferter Salzlösung (500ml PBS) hergestellt. Nach diesem Waschvorgang wurde der

Überstand von der zentrifugierten Blutprobe mit einer Pipette entfernt, sodass am Boden des Röhrchens ein kleines Zellpellet erhalten blieb.

Der Antikörpermix ist folgendermaßen hergestellt worden:

Tab.1: Herstellung der Antikörpermixtur und deren Emissionswellenlängen

Antikörper	Menge	Klon	Hersteller	Anregung	Emissionswellenlänge
CD86 PE	4µl	HA5.2B7	Beckman Coulter	488	578
CD14 PerCP	4µl	M-Phi-P9	Becton Dickinson, Heidelberg D.	488	680
CD 16 FITC	1µl	3G8	Beckman Coulter	488	525
FACS-Puffer	41µl				

Der Mix war im Vortex gemischt, zum Zellpellet gegeben und erneut im Vortex gemischt worden. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern 30 Minuten bei vier Grad Celsius im Kühlschrank inkubiert. Der CD86-Antikörper diente hierbei der Differenzierung der Gesamtpopulation der Monozyten von anderen Zellen des peripheren Blutes, indem er den kostimulatorischen Faktor CD86 markierte. Dieser wird nur auf aktivierten B-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert (72). Die CD14- und CD16-Antikörper dienten der Unterscheidung der entsprechenden Subpopulationen.

Durch Zugabe von zwei Millilitern BD-Lysing-Solution (Herstellung: 5ml BD Lysing Solution 10-fach + 45 ml Aqua dest.) wurde die Färbung gestoppt. Nach erneuter Mischung im Vortex wurde die Lösung weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde erneut mit zwei Millilitern FACS-Puffer gewaschen und fünf Minuten bei 1.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet in 200 µl 1% Paraformaldehyd fixiert und bei vier Grad Celsius gelagert, bis die durchflusszytometrische Messung erfolgte. Erfolgte diese direkt im Anschluss, konnte auf die Fixierung verzichtet und stattdessen das Pellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen werden (73, 74).

3.3.3 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit dem Gerät FACS Calibur (Becton, Dickinson) durchgeführt. FACS steht abkürzend für „Fluorescence activated cell sorting“ und stellt ein optisches Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von Zellpopulationen dar. Dabei werden die Zellen durch eine Hüllflüssigkeit in einer Kapillare an einer Lichtquelle vorbei geführt. Die Hüllflüssigkeit dient dazu, die Zellen in einen laminaren Strom zu bringen, sodass sie einzeln auf die Lichtquelle treffen. Diese besteht im FACS Calibur aus einem gekühlten Argon-Ionen-Laser und einem roten Diodenlaser.

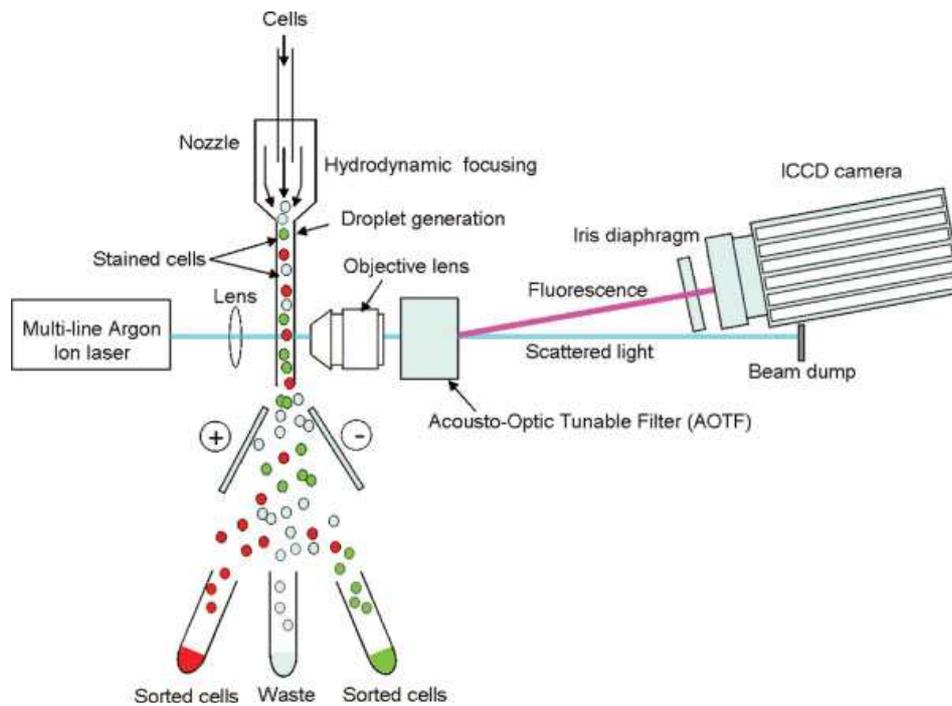


Abb. 9 Das Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung (aus 75)

Die physikalischen Messgrößen sind dabei das Vorwärtstreulicht (FSC) und das Seitwärtstreulicht (SSC), welches in einem Winkel von 90° gemessen wird. Das Vorwärtstreulicht ist dabei ein Maß für die Größe einer Zelle, während das Seitwärtstreulicht von der Granularität der Zellen abhängt, d.h. von den intrazellulären Bestandteilen. Durch die Analyse dieser Eigenschaften können bereits Zuordnungen zu den einzelnen Leukozytenpopulationen getroffen werden.

Um weitere Zuordnungen zu verschiedenen Subpopulationen treffen zu können, werden fluorchromkonjugierte Antikörper benutzt und die Zellen damit markiert. Die Antikörper binden an bestimmte Oberflächenmoleküle, von denen zahlreiche als CD-Moleküle („cluster of differentiation“) bezeichnet werden, und emittieren optische Signale verschiedener Wellenlängen, die durch Photodioden und Photomultiplier ebenfalls im 90° Winkel detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Als Farbstoffe wurden FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridinin Chlorophyll) verwendet. Dadurch war es möglich, eindeutige Zuordnungen zu den einzelnen Subpopulationen zu treffen.

Die bei der FACS-Analyse gemessenen Zellen wurden anschließend in einem DotPlot dargestellt, wobei zuerst die mit dem CD86-Antikörper markierten Zellen gegen das Seitwärtstreulicht, d.h. gegen deren Granularität dargestellt wurden. Jeder Punkt entspricht dabei einer Zelle. Die so bestimmte Monozytenpopulation wurde als Region 1 (R1) bezeichnet.

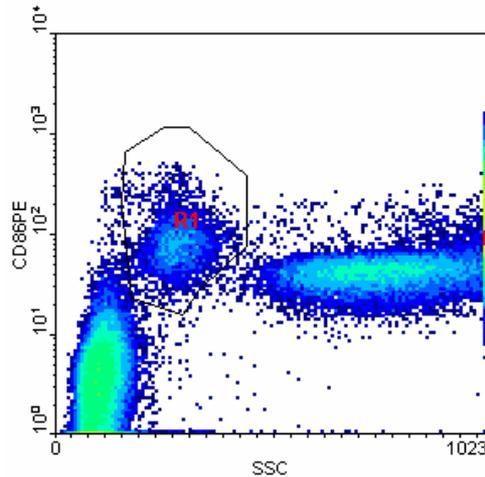


Abb. 10 Im ersten Schritt werden SSC und CD86-Antikörper gegeneinander aufgetragen. Mit R1 wird die Monozytenpopulation bezeichnet.

Im folgenden Schritt wurden die Zellen noch einmal hinsichtlich Größe und Granularität bestimmt, indem das Seitwärtsstreulicht gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen wurde. Hier wurden jedoch nur die Zellen der R1, d.h. die bereits bestimmten Monozyten eingeschlossen, um eine möglichst genaue Zahl der gesamten Monozyten zu erhalten.

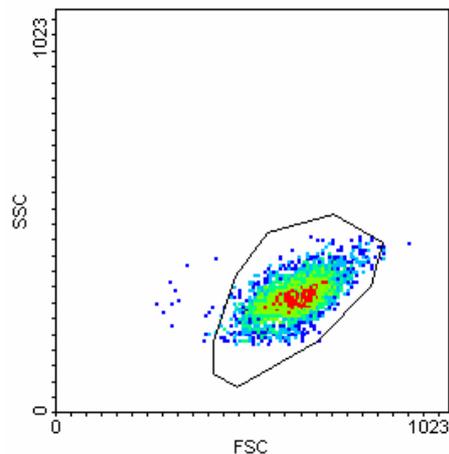


Abb. 11 Im zweiten Schritt waren die Zellen nach SSC und FSC bestimmt worden, wobei nur die Monozytenwolke betrachtet wurde. So lässt sich die Gesamtpopulation genauer bestimmen („Backgating“).

Um die einzelnen Subpopulationen voneinander abgrenzen zu können, waren anschließend die mit dem CD14-Antikörper konjugierten Monozyten gegen die mit dem CD16-Antikörper konjugierten Monozyten aufgetragen worden. So entstand ein heterogenes Bild, in welchem die Subpopulationen gut voneinander abgegrenzt und in weitere „regions“ aufgeteilt werden konnten (R3 bis R7).

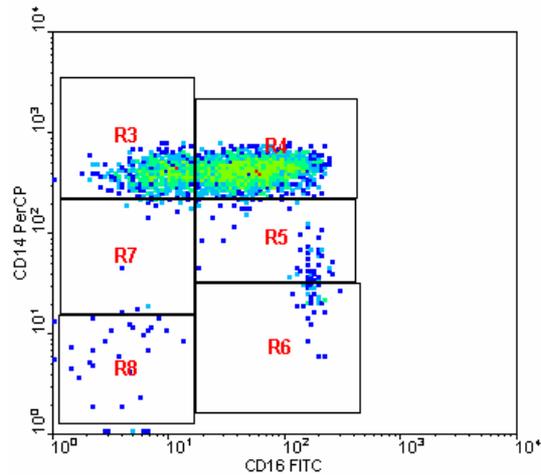


Abb. 12 Im letzten Schritt werden die mit CD14PerCP und die mit CD16FITC markierten Monozyten dargestellt. So kann zwischen Subpopulationen unterschieden werden. Die einzelnen Subpopulationen werden mit R3 bis R7 benannt.

Zur Auswertung wurden anschließend die „regions“ in drei verschiedene Subpopulationen zusammengefasst, wobei folgende Gruppen entstanden:

Mo1= R3+R7: CD14⁺⁺/CD16⁻ Monozyten

Mo2= R4: CD14⁺⁺/CD16⁺ Monozyten

Mo3= R5+R6: CD14⁻/CD16⁺ Monozyten.

3.4 EndoPAT-Messung:

3.4.1 Prinzip

Die EndoPAT-Technologie ist eine nichtinvasive Möglichkeit zur Untersuchung der Endothelfunktion anhand des Gefäßtonus der peripheren Gefäße. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Digitalarterien beider Zeigefinger zur Analyse verwendet. Die Abkürzung PAT steht hierbei für „peripheral arterial tone“. Verwendet wurde das EndoPAT 2000 der Firma Itamar Medical®, Caesarea, Israel.

Es werden Fingerproben verwendet, in denen sich ein plethysmografisches System befindet. Dieses baut während der Messung einen Druck auf, der 10 mmHg unter dem diastolischen Blutdruck liegt, was einerseits die Proben am Finger fixiert und damit Artefakte vermindert und andererseits ein venöses Pooling verhindert. Durch Sensoren werden in beiden Zeigefingern automatisch alle 30 Sekunden Volumen- und Tonusveränderungen registriert und als Pulsamplitude aufgezeichnet.



Abb.13 EndoPAT 2000 von Itamar
(aus 76)

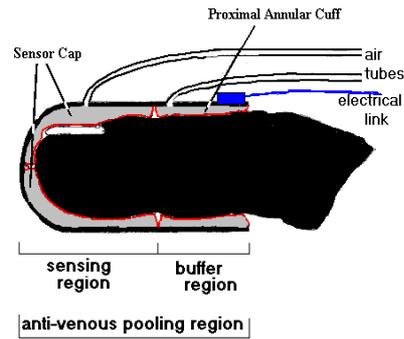


Abb.14 Aufbau der Fingerproben
(aus 48)

3.4.2 Durchführung

Alle Patienten wurden am Tag vor der Untersuchung über den Ablauf aufgeklärt. Die Untersuchung erfolgte zwischen 7.00 Uhr und 8.00 Uhr morgens im nüchternen Zustand. Die Patienten wurden im Patientenbett in einem abgedunkelten Raum bei absoluter Ruhe untersucht. Beengende Kleidung und Schmuck wurden vor der Untersuchung entfernt.

Es wurde zunächst der Blutdruck nach der Riva-Rocci-Methode gemessen, anschließend wurde fünf Minuten lang unter Ruhebedingungen ein Basalwert mit dem EndoPAT-Gerät aufgezeichnet. Es folgte eine Ischämiephase, indem die Blutzufuhr mittels einer Blutdruckmanschette für weitere fünf Minuten gedrosselt wurde. Die Manschette wurde dazu auf suprasystolische Werte (20 mmHg über dem systolischen Blutdruck) inflatiert. Nach Lösen der Stauung wurde weitere fünf Minuten die Reaktion der Gefäße auf die reaktive Hyperämie aufgezeichnet.

3.4.3 Analyse

Die 15 Minuten der Untersuchung bilden sich folgendermaßen ab:

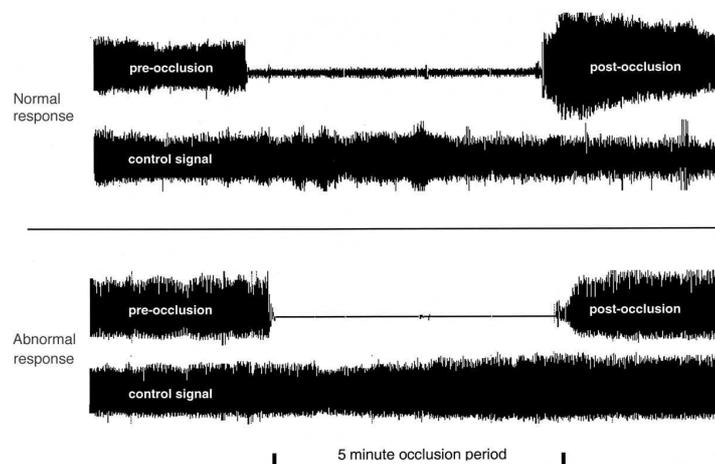


Abb.15 Darstellung der Pulsamplituden mit dem EndoPAT 2000 (aus 49)

Die sogenannte PAT-ratio wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PAT-ratio} = \ln [(X_{ht}/X_{h0})/(X_{ct}/X_{co})]$$

Mit X wird die Pulsamplitude bezeichnet, h bezeichnet den hyperämischen Finger, c den Kontrollfinger. Es wurde also für jeden Finger der Quotient aus der Pulsamplitude der hyperämischen Phase (t) und dem Basalwert (0) berechnet, anschließend wurde ein weiterer Quotient aus Messfinger und Kontrollfinger gebildet und daraus der Logarithmus berechnet (73). Nach aktueller Literatur besteht ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei einer PAT-ratio <2, ab einer Ratio <1,67 besteht eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 77% für die Diagnose einer koronaren endothelialen Dysfunktion (76).

3.5 Follow-up

Zur Langzeitverlaufsbeobachtung wurde den Patienten postalisch im angestrebten Zeitraum von zwölf Monaten ein standardisierter Fragebogen zugeschickt, den sie ausgefüllt zurückschicken sollten. Anbei fand sich ein Anschreiben, indem der Grund für diese Befragung kurz dargestellt und die Patienten um Mitarbeit gebeten wurden. Vor Verschicken des Anschreibens wurde eine Liste der Patienten an das Klinikrechenzentrum gesandt, um bereits verstorbene Patienten oder deren Angehörige nicht durch diese Befragung zu bemühen. Auch Patienten, die sich zum Zeitpunkt des Follow-ups stationär im UKH auf Grund einer kardialen Erkrankung befanden, wurden nicht angeschrieben, sondern es wurden die Daten des aktuellen Krankenhausaufenthaltes ausgewertet. Patienten, die den Fragebogen nicht zurückschickten, wurden telefonisch kontaktiert. War auch auf diesem Weg keine Kontaktaufnahme möglich, wurde im nächsten Schritt ein Schreiben an die betreffenden Bürgerämter geschickt, um im Falle eines Umzugs eine neue Anschrift bzw. im Todesfall Datum und wenn möglich Todesursache zu ermitteln. Zuletzt wurden die behandelnden Hausärzte kontaktiert.

Das Follow-up inklusive des Kontaktierens der Bürgerämter und der Hausärzte erstreckte sich bis September 2011. Insgesamt konnte von 80 Patienten ein Follow-up ermittelt werden (100%), wovon 64 Patienten (80%) das Schreiben zurücksendeten. Zum Zeitpunkt des Follow-ups waren acht Patienten (10%) verstorben.

Die Patienten der Kontrollgruppe wurden von Dezember 2008 bis Juni 2010 untersucht, die Follow-up-Fragebögen dazu von Januar 2010 bis August 2011 verschickt, 30 Patienten (75%) schickten den Fragebogen ausgefüllt zurück. Im Dezember 2011 konnte bei weiteren sechs Patienten das Follow-up telefonisch erhoben werden. Von vier Patienten (10%) konnten keine Daten erhoben werden. Von der Kontrollgruppe war bei der Datenerhebung des Follow-ups ein Patient (2,5%) verstorben.

3.6 Statistische Auswertung

Die bei Einschluss der Patienten wie auch die im Follow-up erhobenen Patientendaten wurden in eine dafür angelegte Microsoft Excel® Tab. eingegeben. Für die statistische Auswertung der Studie wurde das Programm SPSS 14.0® verwendet.

Zur Beschreibung kontinuierlicher, normal verteilter Variablen wurden Mittelwert und Standardabweichung bemüht, für das Vergleichen dieser Mittelwerte zwischen zwei Gruppen der T-Test. Zur Darstellung kontinuierlicher, schief verteilter Variablen wurden Median und 25% bzw. 75% Quartile beschrieben, zum Vergleich dieser Variablen kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Kategoriale Variablen wurden in absoluten Zahlen und Prozenten beschrieben, hier wurde zum Vergleich der Gruppen der Chi-Quadrat-Test genutzt. Als signifikant wurden Unterschiede angesehen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 5 % einem Fehler 1. Art zugeschrieben werden konnten ($p < 0,05$).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

4.1.1. Anamnestische Angaben und Risikofaktoren

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie umfasste insgesamt 120 Patienten, wovon 41 weiblich und 79 männlich waren. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung unterschieden sich Fall- und Kontrollgruppe, der Anteil männlicher Probanden lag bei 73,8% bei den Patienten mit KHK, und bei 50% in der Kontrollgruppe ($p=0,01$). Bezüglich des Alters konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, das durchschnittliche Alter betrug bei den Patienten mit KHK 68,2 ($\pm 10,8$) Jahre, in der Kontrollgruppe 64,5 ($\pm 9,9$) Jahre ($p=0,063$).

In Bezug auf die kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten sich deutliche Unterschiede. Bei den Patienten mit KHK litten signifikant mehr Patienten an einem Diabetes mellitus (35% vs. 10%, $p=0,004$), einem arteriellen Hypertonus (97,5% vs. 60%, $p<0,001$) und einer Dyslipoproteinämie (81% vs. 22,5%, $p<0,001$). Alle Patienten, die an einer PAVK litten ($n=25$), anamnestisch einen Myokardinfarkt erlitten hatten ($n=34$) oder sich einer perkutanen Koronarintervention ($n=62$) sowie einer aortokoronaren Bypassoperation ($n=24$) unterzogen hatten, gehörten ebenfalls zur Gruppe der Patienten mit KHK. Auch das Ereignis eines Schlaganfalls oder einer TIA lag signifikant häufiger in der KHK-Fallgruppe vor (16,3% vs. 2,5%, $p=0,027$), wobei ein Patient an einer sonografisch gesicherten Stenose der Arteria carotis litt. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei der Messung des Knöchel-Arm-Index (ABPI), dieser lag im Mittel bei 0,91 ($\pm 0,24$) in der Fallgruppe und bei 1,07 ($\pm 0,12$) in der Kontrollgruppe ($p=0,007$).

Der Anteil der Raucher unterschied sich nicht wesentlich (15,1% vs. 12,5%, $p=0,569$), ebenso zeigte der Anteil an Patienten mit einer positiven Familienanamnese für Herz-Kreislauferkrankungen (59% vs. 44,7%, $p=0,149$) und dem Vorliegen eines Vorhofflimmerns bzw. -flatterns (31,6% vs. 35,7%, $p=0,693$) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Mittelwerte des Body-Mass-Index (27,8 vs. 28,3, $p=0,509$) waren wie die Mittelwerte der Waist-Hip-Ratio sowie des systolischen und diastolischen Blutdrucks in beiden Gruppen ähnlich verteilt (siehe Tab. 2).

Bei der Anzahl der betroffenen Gefäße zeigte sich folgende Verteilung: 18 (23,1%) Patienten wiesen eine koronare Eingefäßerkrankung auf, bei 17 (21,8%) Patienten wurde eine Zweigefäßerkrankung diagnostiziert, und bei 42 (53,8%) Patienten waren alle drei Hauptgefäße betroffen.

Tab. 2 Charakteristika anhand anamnestischer Angaben, Risikofaktoren und klinischen Befunden für Patienten mit KHK und denen der Kontrollgruppe

Variable	N	Gesamt	Patienten mit KHK	Kontrollen	p-Wert
Geschlecht, n (%)	120	W=41 (34,2) M=79 (65,8)	W=21 (26,3) M=59 (73,8)	W=20 (50) M=20 (50)	0,010
Alter, Jahren	120	66,9 (\pm 10,6)	68,2 (\pm 10,8)	64,5 (\pm 9,9)	0,063
Raucher, n (%)	119	18 (15,1)	13 (16,5)	5 (12,5)	0,569
Diabetes mellitus, n (%)	120	32 (26,7)	28 (35)	4 (10)	0,004
Arterieller Hypertonus, n (%)	120	102 (85)	78 (97,5)	24 (60)	<0,001
DLP, n (%)	119	73 (61,3)	64 (81)	9 (22,5)	<0,001
Pos. FA, n (%)	116	63 (54,3)	46 (59)	17 (44,7)	0,149
PAVK, n (%)	118	25 (21,2)	25 (31,3)	0 (0)	<0,001
MI, n (%)	119	34 (28,6)	34 (43)	0 (0)	<0,001
PTCA, n (%)	120	62 (51,7)	62 (77,5)	0 (0)	<0,001
ACB, n (%)	120	24 (20)	24 (30)	0 (0)	<0,001
Stroke/TIA, n (%)	120	14 (11,7)	13 (16,3)	1 (2,5)	0,027
Carotisstenose, n (%)	120	1 (0,8)	1 (1,3)	0 (0)	0,478
VHF, n (%)	107	30 (32,7)	25 (31,6)	10 (35,7)	0,693
BMI, kg/m²	115	27,9 (\pm 4,4)	27,8 (\pm 4,5)	28,3 (\pm 4,3)	0,509
WHR	95	0,95 (\pm 0,08)	0,96 (\pm 0,07)	0,92 (\pm 0,09)	0,072
RR syst, mmHg	110	133,8 (\pm 22)	132,8 (\pm 22,5)	135,5 (\pm 21,1)	0,532
RR diast, mmHg	101	77,5 (\pm 9,8)	76,9 (\pm 10,4)	78,4 (\pm 8,6)	0,416
ABPI	92	0,94 (\pm 0,23)	0,91 (\pm 0,24)	1,07 (\pm 0,12)	0,007

kontinuierliche, normal verteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, kategoriale Variablen als absolute Werte und prozentualer Anteil; DLP = Dyslipoproteinämie, pos. FA = positive Familienanamnese, PAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, MI = stattgehabter Myokardinfarkt, PTCA = vorherige perkutane transluminale koronare Angioplastie, ACB = Z.n. aortocoronarer Bypassoperation, TIA = transitorisch ischämische Attacke, VHF = Vorhofflimmern/-flattern, BMI = Body Mass Index, WHR = Waist-Hip-Ratio, RR syst. und diast. = systolischer und diastolischer Blutdruck, ABPI = Ankle-Brachial-Pressure-Index.

4.1.2 Laborwerte

Bei allen Patienten wurden im Rahmen des stationären Aufenthaltes die in Tab. 3 aufgeführten Routinelaborparameter bestimmt. Besondere Bedeutung als kardiovaskuläre Risikofaktoren besitzen dabei die Blutfettwerte. Die Mittelwerte des Gesamtcholesterins und des LDL-Cholesterins zeigten statistisch signifikante Unterschiede in beiden Gruppen, wobei die Probanden der Kontrollgruppe überraschenderweise die höheren Werte aufwiesen (Cholesterin $4,6 \pm 1,36$

mmol/l vs. $5,7 \pm 1,14$ mmol/l, $p=0,001$; LDL $2,7 \pm 2,0$ mmol/l vs. $3,8 \pm 1,15$ mmol/l, $p=0,002$). Die Werte der TG und des HDL unterschieden sich nicht wesentlich, wobei auffiel, dass das HDL-Cholesterin als einziger aller Lipidstoffwechsel-Parameter in der Fallgruppe den Referenzwert von $>1,5$ mmol/l unterschritt.

Die medianen Werte des Akut-Phase-Proteins CRP, welches ebenso prognostische Relevanz bei der KHK besitzt, zeigten keine erheblichen Unterschiede (5,0 vs. 6,1 mg/l; $p=0,765$), waren jedoch in der Kontrollgruppe leicht erhöht (Referenzwert: <5 mg/l).

Das BNP besitzt Bedeutung bei der Diagnostik und Prognoseabschätzung einer Herzinsuffizienz und lag hier in der Fallgruppe mit einem medianen Wert von 115 pg/ml (50/274) über dem Referenzwert von <100 pg/ml und damit signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,020$).

Die medianen Werte der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff wiesen bei den Patienten mit KHK mit statistischer Signifikanz höhere Werte auf als in der Kontrollgruppe (Kreatinin $90,5$ $\mu\text{mol/l}$ vs. $75,5$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,027$; Harnstoff $6,0$ mmol/l vs. $4,3$ mmol/l, $p=0,006$). Dies galt jedoch nicht für die nach Cockcroft-Gault kalkulierte GFR ($p=0,095$).

Der Nachweis einer Mikroalbuminurie und vor allem eine Erhöhung des Albumin-Creatinin-Quotienten im Urin (ACR) gelten nach neusten Erkenntnissen als Marker der endothelialen Dysfunktion. Allerdings lagen im vorliegenden Patientenkollektiv beide Werte unter dem Referenzwert von <30 mg/l bzw. von $3,4$ g/l. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe lag nicht vor ($p=0,686$ bzw. $p=0,155$).

Weiterhin war das Hämoglobin in der Kontrollgruppe im Mittel mit $8,6 (\pm 0,73)$ mmol/l höher als in der Fallgruppe mit $8,1 (\pm 1,08)$ mmol/l ($p=0,011$). Der mediane Wert der INR war in beiden Gruppen mit $0,99$ bzw. $1,0$ gleich ($p=0,630$).

Tab. 3 Laborwerte

Variable	Gesamt	Patienten mit KHK	Kontrollen	p-Wert
INR	1,01 (0,96/1,15)	0,99 (0,94/1,2)	1,0 (0,96/1,12)	0,630
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	87 (70/108,3)	90,5 (71,8/116,8)	75,5 (63,5/91)	0,027
Harnstoff (mmol/l)	5,6 (4,3/7,3)	6,0 (4,5/9,1)	4,3 (3,7/5,9)	0,006
GFR	77,8 ($\pm 39,7$)	73,9 ($\pm 38,2$)	91,6 ($\pm 42,4$)	0,095
Triglyceride (mmol/l)	1,5 (1,1/2,1)	1,5 (1,1/1,9)	1,4 (0,7/2,2)	0,326
Gesamtcholesterin (mmol/l)	4,8 ($\pm 1,4$)	4,6 ($\pm 1,36$)	5,7 ($\pm 1,14$)	0,001
LDL-Chol. (mmol/l)	2,9 ($\pm 1,18$)	2,7 ($\pm 2,0$)	3,8 ($\pm 1,15$)	0,002
HDL-Chol. (mmol/l)	1,9 ($\pm 0,35$)	1,06 ($\pm 0,34$)	1,21 ($\pm 0,38$)	0,128
LDL/HDL	2,87 ($\pm 1,27$)	2,74 ($\pm 1,22$)	3,38 ($\pm 1,34$)	0,076
CRP (mg/l)	5,0 (5,0/14,8)	5,0 (5,0/16,1)	6,1 (5,0/10,3)	0,765
BNP (pg/ml)	105 (48,5/259)	115 (50,3/273,5)	56 (21/91,8)	0,020
Hämoglobin (mmol/l)	8,2 ($\pm 1,0$)	8,1 ($\pm 1,08$)	8,6 ($\pm 0,73$)	0,011
Albuminurie (mg/l)	6,4 (3,5/15,5)	6,5 (3,7/15,6)	10,8 (4,9/19,7)	0,686
ACR (g/l)	0,62 (0,43/1,36)	0,67 (0,45/1,42)	0,46 (0,37/1,72)	0,155

Kontinuierliche normal verteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, kontinuierliche schief verteilte Variablen sind als Median und 25% bzw. 75% Quartile angegeben; INR = International Normalized Ratio, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, LDL-Chol. = Low density lipoprotein-Cholesterin, HDL-Chol. = High density lipoprotein-Cholesterin, LDL/HDL = Quotient aus LDL und HDL, CRP = C-reaktives Protein, BNP = brain natriuretic peptide, ACR = Albumin-Kreatinin-Ratio im Spontanurin

4.1.3. Differentialblutbild

Beim Betrachten des Differentialblutbildes fiel auf, dass bei allen Zellpopulationen mit Ausnahme der Lymphozyten signifikante Unterschiede bestanden. Bereits die Gesamtleukozytenzahl als proinflammatorische Zellpopulation war bei den Patienten mit KHK deutlich höher ($7,49 \pm 1,9$ vs. $6,36 \pm 1,47$; $p=0,001$), auch der Mittelwert der Gesamtmonozytenzahl war hier mit statistischer Signifikanz höher als in der Kontrollgruppe ($0,69 \pm 0,24$ vs. $0,53 \pm 0,18$; $p<0,001$). Ebenso verhielt es sich mit den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, wobei erstere vor allem auf akute bakterielle Infektionen hinweisen, und letztere eher als Parameter für allergische und atopische Diathesen gelten. Auch deren mediane Werte waren in der KHK-Fallgruppe wesentlich höher (siehe Tab. 4).

Tab. 4 Differentialblutbild, Angaben als absolute Zahlen in Gpt/l

Variable	Gesamt	Patienten mit KHK	Kontrollgruppe	p-Wert
Gesamtleukozyten	7,15 ($\pm 1,86$)	7,49 ($\pm 1,9$)	6,36 ($\pm 1,47$)	0,001
Neutrophile	4,17 (3,4/5,2)	4,28 (3,53/5,33)	3,73 (3,06/4,29)	0,009
Lymphozyten	1,79 ($\pm 0,51$)	1,76 ($\pm 0,52$)	1,85 ($\pm 0,49$)	0,393
Monozyten	0,64 ($\pm 0,23$)	0,69 ($\pm 0,24$)	0,53 ($\pm 0,18$)	<0,001
Eosinophile	0,18 (0,12/0,28)	0,21 (0,13/0,3)	0,14 (0,075/0,22)	0,009

Kontinuierliche normal verteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, kontinuierliche schief verteilte Variablen sind als Median und 25% bzw. 75% Quartile angegeben

4.1.4 Medikamenteneinnahme bei Aufnahme

Die Verteilung der Medikamenteneinnahme bei Aufnahme der Patienten in die Studie deckte sich mit der in Tab. 2 aufgeführten Verteilung der Risikofaktoren im Patientenkollektiv. So fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ausschließlich bei der antihypertensiven und lipidsenkenden Medikation sowie bei der Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern. Im Vergleich dazu zeigten sich relevante Unterschiede im Auftreten von arterieller Hypertonie, DLP und den verschiedenen Manifestationsformen der Atherosklerose wie MI, TIA/Stroke, PAVK etc. (siehe Tab. 2). Fast 95% der Fallgruppe erhielten zum Aufnahmezeitpunkt eine Therapie mit Betablockern, dagegen nur 65% der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Einer Behandlung mit ACE-Hemmern unterzogen sich 78,5% der Patientengruppe vs. 35,3% der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Noch deutlicher wurden die Unterschiede bei der lipidmodulierenden Therapie mit Statinen (78,5% vs 11,8%, $p < 0,001$).

Da alle Patienten der Fallgruppe an einer gesicherten KHK litten, waren erhebliche Unterschiede bei der antithrombotischen Therapie mit ASS bzw. Clopidogrel oder deren Kombination zu erwarten ($p < 0,001$). Insgesamt 22,8% der Patienten standen zum Aufnahmezeitpunkt unter ASS-Medikation, 7,6% unter Medikation mit Clopidogrel, 50,6% erhielten eine duale Thrombozytenaggregationshemmung. Es standen 15 der Patientengruppe (19%) mit gesicherter KHK unter keiner thrombozytenaggregationshemmenden Therapie, wovon zwölf mit oralen Antikoagulantien und drei Patienten mit Heparin behandelt wurden.

Bei der Einnahme von Digitalisglykosiden, Antiarrhythmika, Diuretika und weiteren in Tab. 5 aufgeführten Medikamenten zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen Patienten mit KHK und denen der Kontrollgruppe.

Tab. 5 Medikation

Medikament	Gesamt (n=96)	Patienten mit KHK (n=79)	Kontrollen (n=17)	p-Wert
β-Blocker, n (%)	86 (89,6)	75 (94,9)	11 (64,7)	<0,001
ACE-Hemmer, n (%)	68 (70,8)	62 (78,5)	6 (35,3)	<0,001
ARB, n (%)	22 (22,9)	19 (24,1)	3 (17,6)	0,569
Diuretika, n (%)	62 (64,6)	54 (68,4)	8 (47,1)	0,096
Ca⁺⁺-Antagonisten, n (%)	25 (26)	23 (29,1)	2 (11,8)	0,139
Aldosteronantagonisten, n (%)	11 (11,5)	11 (13,9)	0 (0)	0,102
Antiarrhythmika, n (%)	10 (10,5)	8 (10,3)	2 (11,8)	0,854
Orale Antikoagulation, n (%)	27 (28,1)	23 (29,1)	4 (23,5)	0,642
Digitalis, n (%)	11 (11,6)	10 (12,8)	1 (5,9)	0,418
Lipidsenker, n (%)				<0,001
Statin	64 (66,7)	62 (78,5)	2 (11,8)	
Ezetrol	5 (5,2)	5 (6,3)	0 (0)	
Andere	6 (6,3)	6 (7,6)	0 (0)	
TAH, n (%)				<0,001
ASS	22 (22,9)	18 (22,8)	4 (23,5)	
Clopidogrel	6 (6,3)	6 (7,6)	0 (0)	
ASS + Clopidogrel	40 (41,7)	40 (50,6)	0 (0)	

Angaben in Absolutwerten und (%), β-Blocker = Beta-Adrenorezeptoren-Blocker, ACE-Hemmer = Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor, ARB = Angiotensin-II-Rezeptor-I-blocker, Ca⁺⁺-Antagonisten = Calcium-Antagonisten, TAH = Thrombozytenaggregationshemmer, ASS = Acetylsalicylsäure

4.1.5 Die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im Patientenkollektiv

Wie bereits im Abschnitt Methodik beschrieben, wurden die durchflusszytometrisch analysierten Monozyten in drei Subpopulationen eingeteilt, welche als Mo1, Mo2 und Mo3 bezeichnet werden. Die Summe aus Mo2 und Mo3 repräsentieren hierbei die Gesamtgruppe der CD16+ Monozyten. Für jede Subpopulation wurden neben der Angabe in absoluten Zahlen der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der Monozyten berechnet sowie die absolute Anzahl bezogen auf einen Mikroliter Blut.

Bei der Betrachtung der prozentualen Monozytenverteilung fiel auf, dass die drei Subpopulationen etwa in einem prozentualen Verhältnis von Mo1:Mo2:Mo3 = 40:35:25% vorhanden waren (siehe Tab. 6).

Die Absolutwerte der zytometrisch analysierten Monozytenzahlen zeigten zudem keinen relevanten Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe. Bei der Auswertung der Absolutzahlen, bezogen auf einen Mikroliter Blut, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Verteilung der Mo1 ($p=0,007$). Relative und absolute Differenzen zwischen den Gruppen waren bzgl. Mo2 und Mo3 nicht unterschiedlich, wobei die absoluten Werte für Mo3 tendenziell höher in der Patientengruppe lagen ($174 (\pm 101)$ vs. $141 (\pm 69)$, $p=0,058$).

Tab. 6 Verteilung der Monozyten-Subpopulationen

Variable	Gesamt	Patienten mit KHK	Kontrollen	p-Wert
N=114				
Mo1(counts)	1331 (827/2451)	1352 (831/2497)	1233 (694/1789)	0,612
Mo2 (counts)	1573,5 ($\pm 866,8$)	1548,5 (± 889)	1632 (± 822)	0,628
Mo3 (counts)	1089 (± 535)	1052 (± 522)	1176 (± 562)	0,274
N=114				
Mo1 (%)	39,3 ($\pm 19,6$)	40,4 ($\pm 20,1$)	36,6 ($\pm 18,2$)	0,315
Mo2 (%)	35,2 ($\pm 16,5$)	34,5 ($\pm 16,6$)	36,9 ($\pm 16,4$)	0,464
Mo3 (%)	25,6 ($\pm 11,3$)	25,1 ($\pm 11,6$)	26,7 ($\pm 10,7$)	0,474
N=108				
Mo1 (counts/μl)	211 (112/336)	251 (141/384)	157 (90/233)	0,007
Mo2 (counts/μl)	221 (± 123)	229 (± 126)	199 (± 116)	0,259
Mo3 (counts/μl)	165 (± 95)	174 (± 101)	141 (± 69)	0,058

Kontinuierliche normal verteilte Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, kontinuierliche schief verteilte Variablen sind als Median und 25% bzw. 75% Quartile angegeben; Mo1 = CD14⁺⁺/CD16-Monozyten, Mo2 = CD14⁺⁺/CD16⁺Monozyten, Mo3 = CD14⁻/CD16⁺Monozyten

4.1.6 Das Verhalten des RH-PAT-Index im Patientenkollektiv

Der mediane PAT-Index als Marker der endothelialen Dysfunktion lag bei 1,7 (1,46/1,97) im Gesamtkollektiv. Bei getrennter Betrachtung der Fall- und Kontrollgruppe ergab sich ein Median von 1,61 (1,38/1,85) bei den Patienten mit KHK und 1,81 (1,62/2,18) bei den Kontrollpatienten, was einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte ($p < 0,001$). In Abb. 16 sind die medianen Werte des PAT-Index dargestellt.

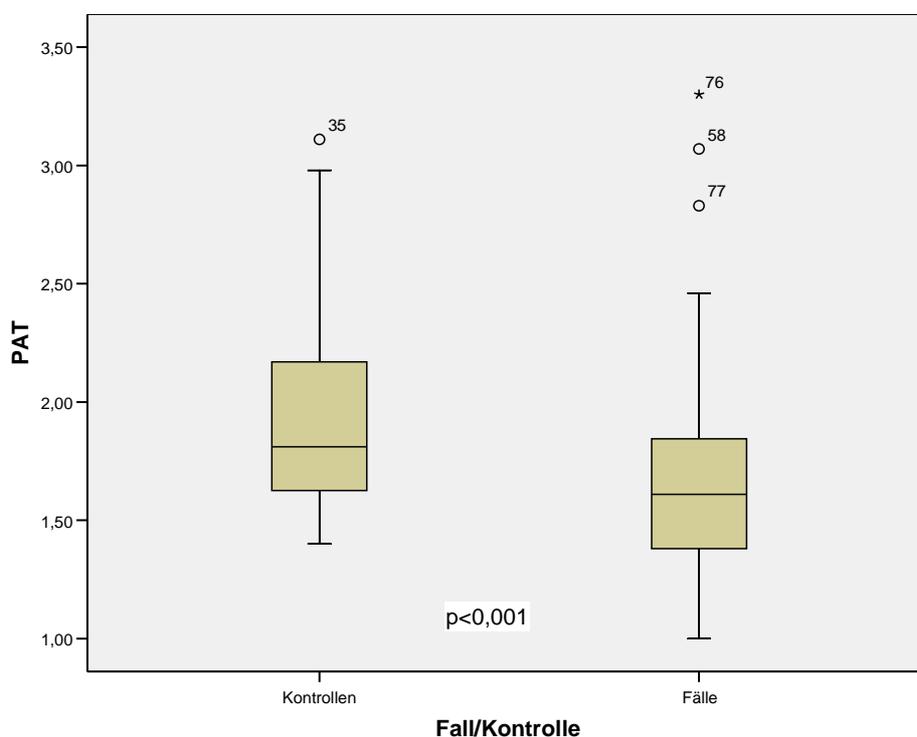


Abb. 16 BoxPlot zur grafischen Darstellung der PAT-Indices in Fall- und Kontrollgruppe
PAT = peripheral arterial tone

4.2 Korrelation von PAT-Index und weiteren Parametern

4.2.1 PAT-Index und kardiovaskuläre Risikofaktoren

In diese Analysen wurden Patienten und Kontrollen eingeschlossen. Der PAT-Index wurde zunächst in Abhängigkeit vom Geschlecht betrachtet, wobei sich ein Median von 1,74 (1,5/2,23) bei Frauen und von 1,68 (1,41/1,92) bei Männern zeigte ($p = 0,124$). In Tab. 7 ist der mediane PAT-Index für weitere kategoriale Variablen aufgeführt. Dabei fiel auf, dass ein relevanter Unterschied nur für das Vorhandensein einer Dyslipoproteinämie, einer PAVK und eines stattgehabten

Myokardinfarktes bestand. Weder bei Rauchern noch bei Patienten mit Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie war der PAT-Index signifikant niedriger als Ausdruck einer gestörten Endothelfunktion.

Tab. 7 PAT- Index bei Patientengruppen mit kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich mit Patienten ohne diesen Risikofaktor; Kategoriale Variablen

Variable	vorhanden	Nicht vorhanden	p-Wert
Raucher	1,58 (1,31/2,1)	1,69 (1,48/1,95)	0,337
Diabetes mellitus	1,54 (1,35/1,84)	1,75 (1,49/2,02)	0,062
Arterieller Hypertonus	1,68 (1,44/1,91)	1,81 (1,49/2,17)	0,201
DLP	1,65 (1,43/1,85)	1,81 (1,5/2,17)	0,045
Positive FA	1,65 (1,44/1,98)	1,74 (1,48/1,94)	0,504
PAVK	1,48 (1,32/1,82)	1,74 (1,5/2,03)	0,010
MI	1,59 (1,34/1,79)	1,75 (1,5/2,05)	0,013

PAT-Index angegeben als Median und 25% bzw. 75% Quartil

DLP = Dyslipoproteinämie, Positive FA = positive Familienanamnese, PAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, MI = stattgehabter Myokardinfarkt

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen PAT-Index und weiteren Risikofaktoren aufzudecken, wurde für kontinuierliche Variablen eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Außerdem wurden alle Patienten nach den geltenden Referenzwerten für den PAT-Index in drei Gruppen aufgeteilt (<1,67; 1,67-2,0; >2,0) und der Zusammenhang mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc-Analyse getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 aufgeführt. Erstaunlicherweise korrelierte keiner der untersuchten Risikofaktoren mit dem PAT-Index, jedoch fand sich eine negative Korrelation nach Pearson für die Waist-Hip-Ratio, die statistisch signifikant war (p=0,041). Alle anderen Parameter zeigten keinen Zusammenhang zu den ermittelten PAT-Indices.

Tab. 8 PAT-Index im Vergleich mit weiteren Risikofaktoren; kontinuierliche Variablen

Variable	PAT-Index				Pearson-Korrelation	
	<1,67	1,67-2,0	>2,0	p-Wert	r	p-Wert
Alter	68,4 (±11,2)	67(±9,4)	63,8 (±10,6)	0,173	- 0,128	0,163
BMI	28,5 (±4,8)	27,4 (±4,0)	27,4 (±4,1)	0,437	- 0,142	0,131
WHR	0,96 (±0,07)	0,96 (±0,09)	0,92 (±0,07)	0,215	- 0,210	0,041
RR syst	133 (±24)	140 (±20)	128 (±19)	0,172	- 0,014	0,882
RR diast	77 (±10)	79 (±10)	77 (±9)	0,704	0,109	0,280
ABPI	0,92 (±0,24)	0,97 (±0,23)	0,97 (±0,19)	0,599	0,072	0,502

angegeben als Mittelwert ±Standardabweichung, einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) und Korrelationskoeffizient nach Pearson (r);

BMI = Body Mass Index, WHR = Waist-Hip-Ratio, RR syst bzw. diast = systolischer bzw. diastolischer Blutdruck nach Riva Rocci, ABPI = Knöchel-Arm-Index

4.2.2 PAT-Index und Medikamenteneinnahme

Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen der Einnahme bestimmter Medikamentengruppen und des PAT-Wertes wurde das gesamte Probandenkollektiv für jede Medikamentengruppe in zwei Gruppen unterteilt, wobei eine Gruppe das Medikament zum Aufnahmezeitpunkt einnahm und die andere nicht. Die medianen PAT-Werte der unterschiedlichen Gruppen wurden anschließend mittels Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen, um eine bestehende Korrelation festzustellen. Für folgende Medikamentengruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied des PAT-Index festgestellt werden: β -Blocker, Angiotensinrezeptorblocker, Kalziumkanalblocker, Lipidsenker, Vitamin-K-Antagonisten, Thrombozytenaggregationshemmer, Digitalisglykoside und Antiarrhythmika. Lediglich bei den Patienten, die mit ACE-Hemmern oder Aldosteronantagonisten behandelt wurden, waren die PAT-Werte signifikant niedriger als bei Patienten, die diese Medikation nicht erhielten (Tab. 9).

Tab. 9 PAT-Index und Medikamenteneinnahme

Medikamente	PAT unter Einnahme	PAT ohne Einnahme	p-Wert
β-Blocker	1,64 (1,43/1,91)	1,7 (1,46/1,89)	0,862
ACE-Hemmer	1,6 (1,36/1,8)	1,83 (1,5/2,11)	0,001
ARB	1,83 (1,46/2,0)	1,63 (1,39/1,82)	0,122
Diuretika	1,61 (1,42/1,81)	1,81 (1,48/2,14)	0,041
Ca⁺⁺-Antagonisten	1,71 (1,36/1,89)	1,65 (1,43/1,91)	0,716
Aldosteronantagonisten	1,44 (1,35/1,63)	1,69 (1,48/1,92)	0,036
Antiarrhythmika	1,77 (1,47/1,89)	1,65 (1,43/1,91)	0,757
Orale Antikoagulation	1,65 (1,42/1,99)	1,67 (1,43/1,86)	0,858
Digitalis	1,74 (1,34/1,95)	1,66 (1,45/1,9)	0,839
Lipidsenker		1,74 (1,5/2,0)	0,400
Statin	1,68 (1,39/1,92)		
Ezetrol	1,59 (1,42/1,64)		
Andere	1,44 (1,33/1,7)		
TAH		1,73 (1,47/1,86)	0,740
ASS	1,66 (1,43/2,03)		
Clopidogrel	1,39 (1,18/1,79)		
ASS + Clopidogrel	1,64 (1,38/1,91)		

PAT-Index angegeben als Median und 25% bzw. 75% Quartil;

β-Blocker = Beta-Adrenorezeptoren-Blocker, ACE-Hemmer = Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor, ARB = Angiotensin-II-Rezeptorblocker, Ca⁺⁺-Antagonisten = Calcium-Antagonisten, TAH = Thrombozytenaggregationshemmer, ASS = Acetylsalicylsäure

4.2.3 PAT-Index und Laborwerte

Um den statistischen Zusammenhang zwischen Endothelfunktion und verschiedenen Laborparametern zu testen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Dabei konnte im vorliegenden Probandenkollektiv für keinen der untersuchten Laborparameter mit Ausnahme des Kreatinins ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Endothelfunktion nachgewiesen werden. Erhöhte Kreatininwerte im Serum waren signifikant mit einer schlechteren Endothelfunktion assoziiert (negative Korrelation, $p=0,021$). Weder für die als Risikofaktor geltenden Fettstoffwechsel-Parameter noch für den inflammatorischen Serummarker CRP konnte eine Korrelation nachgewiesen werden (Vgl. Tab. 10).

Bezüglich der Albuminkonzentration im Urin und der Albumin-Kreatinin-Ratio, die seit wenigen Jahren als Marker der endothelialen Dysfunktion angesehen wird, gab es keinerlei Korrelation zum PAT-Index und damit zur Endothelfunktion.

Gleiches gilt für die Auswertung des Differentialblutbildes; weder für die Leukozyten noch für Monozyten oder andere Zellen des Differentialblutbildes konnte ein relevanter Zusammenhang mit der Endothelfunktion gefunden werden.

Tab. 10 Korrelationsanalyse nach Pearson für den Zusammenhang zwischen PAT-Index und Laborparametern

Pearson-Korrelation		
Variable	R	p-Wert
INR	- 0,007	0,949
Kreatinin (µmol/l)	- 0,233	0,021
Harnstoff (mmol/l)	- 0,170	0,095
TG (mmol/l)	0,102	0,334
Gesamtcholesterin (mmol/l)	0,198	0,057
LDL-Cholesterin (mmol/l)	0,136	0,193
HDL-Cholesterin (mmol/l)	0,183	0,080
CRP (mg/l)	0,008	0,935
BNP (pg/l)	- 0,195	0,074
GFR	0,074	0,469
Albuminurie (mg/l)	- 0,188	0,081
ACR (g/l)	- 0,182	0,097
Hb (mmol/l)	0,003	0,975
Thrombozyten (Gpt/l)	0,161	0,086
Differentialblutbild		
Gesamtleukozyten (Gpt/l)	- 0,127	0,175
Neutrophile (Gpt/l)	- 0,148	0,122
Lymphozyten (Gpt/l)	0,056	0,557
Monozyten (Gpt/l)	- 0,097	0,306
Eosinophile (Gpt/l)	- 0,111	0,250

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

INR = International Normalized Ratio, TG = Triglyceride, LDL = Low density lipoprotein, HDL = High density lipoprotein, CRP = C-reaktives Protein, BNP = brain natriuretic peptide, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, ACR = Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin, Hb = Hämoglobin

4.3 PAT-Index und Monozyten-Subpopulationen

4.3.1 Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs

Um den Zusammenhang zwischen PAT-Index und Monozyten-Subpopulationen zu analysieren, wurden die Patienten nach ihrem PAT-Wert in drei Gruppen eingeteilt, deren Grenzwerte die bereits beschriebenen Normwerte bildeten (<1,67; 1,67-2,0; >2,0). Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurden nun hierfür die Mittelwerte der absoluten Monozytenzahlen berechnet und

miteinander verglichen (siehe Tab. 11). Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich dabei nur für Mo3 ($p = 0,033$), wobei jedoch die höchsten Werte in der Gruppe mit den höchsten PAT-Werten, das heißt mit der besten Endothelfunktion, gemessen wurden (1114 ± 546 vs. 914 ± 470 vs. 1278 ± 542). In den Patientengruppen weiterer Subpopulationen zeigten sich keine relevanten Unterschiede, wenngleich auch hier, vor allem bei den auf die Gesamtzahl der Monozyten in einem Mikroliter Blut berechneten Monozytenzahlen, eine Tendenz erkennbar war.

Tab. 11 Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) der Monozytenverteilung

Variable	PAT-Index			p-Wert
	<1,67	1,67-2,0	>2,0	
Mo1	1597 (± 1010)	1766 (± 1266)	2219 (± 1994)	0,169
Mo2	1619 (± 863)	1404 (± 881)	1707 (± 855)	0,368
Mo3	1114 (± 546)	914 (± 470)	1278 (± 542)	0,033
Mo1 counts/μl	261 (± 166)	248 (± 199)	159 (± 191)	0,949
Mo2 counts/μl	233 (± 114)	196 (± 140)	227 (± 121)	0,412
Mo3 counts/μl	176 (± 83)	141 (± 102)	174 (± 107)	0,236

Verteilung angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung der einzelnen Subpopulationen, aufgeteilt nach PAT-Normwerten

Mo1 = CD14⁺⁺/CD16-Monozyten, Mo2 = CD14⁺⁺/CD16⁺Monozyten, Mo3 = CD14⁻/CD16⁺Monozyten, counts/ μ l = absolute Anzahl bezogen auf einen Mikroliter Blut

4.3.2 Getrennte Betrachtung von Patienten mit KHK und Kontrollen

Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse wurde nach der Betrachtung des Gesamtkollektivs eine getrennte Analyse der Patienten mit KHK und der Kontrollgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse sind nicht tabellarisch aufgeführt, sondern grafisch dargestellt (siehe Abb. 17 bis 19). Zwar ist zu erkennen, dass der mediane PAT-Index in der Kontrollgruppe numerisch höher als in der Gruppe der Patienten mit KHK war (siehe Abschnitt 4.1.6), jedoch konnte kein signifikanter Unterschied unter den nach dem entsprechenden Monozytenwert in Quartile aufgeteilten Patientengruppen festgestellt werden.

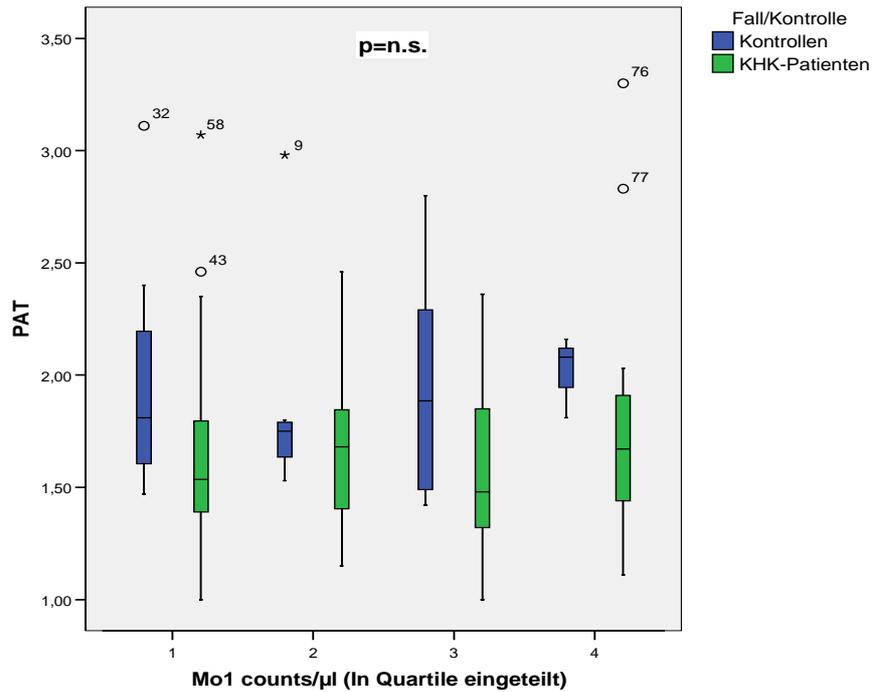


Abb. 17 BoxPlot zur grafischen Darstellung der PAT-Indices in Abhängigkeit von der absoluten Anzahl der CD14⁺⁺/CD16-Monozyten, bezogen auf die Gesamtzahl der Monozyten je Mikroliter, Blut getrennt für Patienten mit KHK und Patienten der Kontrollgruppe

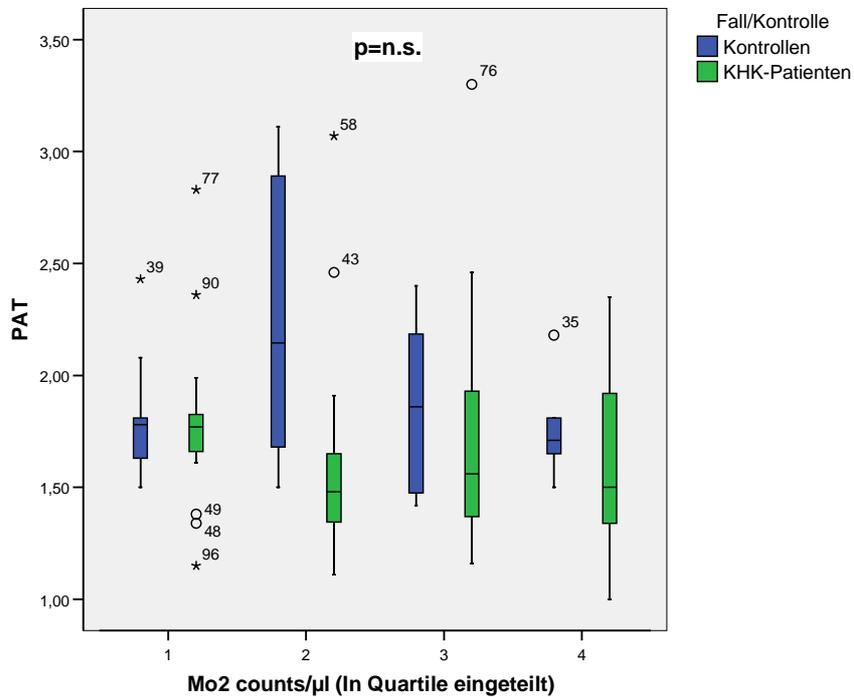


Abb. 18 BoxPlot zur grafischen Darstellung der PAT-Indices in Abhängigkeit von der absoluten Anzahl der CD14⁺⁺/CD16-Monozyten, bezogen auf die Gesamtzahl der Monozyten je Mikroliter, Blut getrennt für Patienten mit KHK und Patienten der Kontrollgruppe

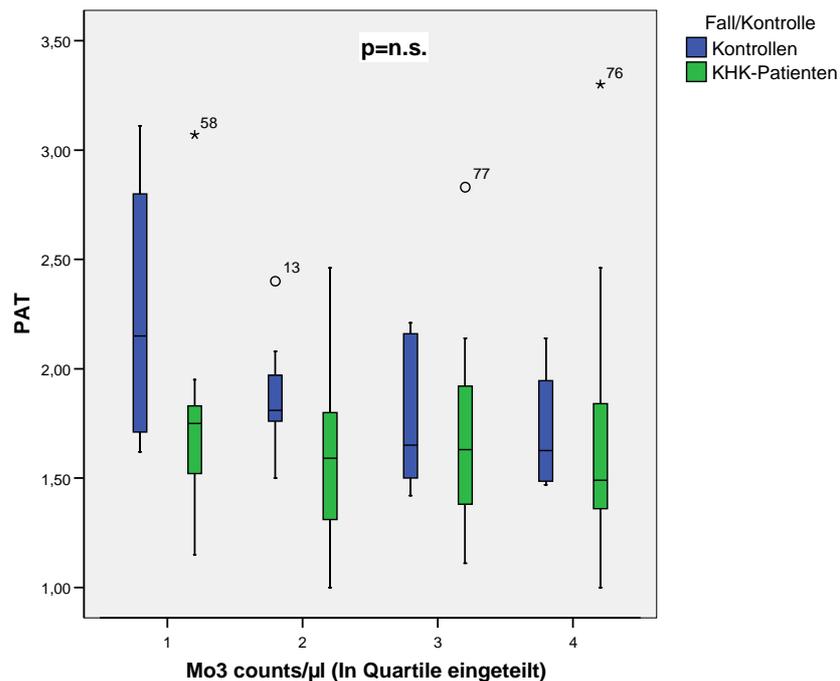


Abb. 19 BoxPlot zur grafischen Darstellung der PAT-Indices in Abhängigkeit von der absoluten Anzahl der CD14-/CD16+ Monozyten, bezogen auf die Gesamtzahl der Monozyten je Mikroliter Blut, getrennt für Patienten mit KHK und Patienten der Kontrollgruppe

4.4 Follow-up und Überlebensanalyse

Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier mit dem primären Endpunkt Tod während des Follow-ups. Dazu wurden die Patienten erneut anhand ihres PAT-Index in drei Gruppen aufgeteilt, welche durch die bereits mehrmals verwendeten Normwerte ($<1,67$; $1,67-2,0$; $>2,0$) definiert wurden. Das mittlere Follow-up im Gesamtkollektiv lag bei 72,4 ($\pm 23,7$) Wochen, für die Patientengruppe 70,6 ($\pm 25,1$) Wochen und die Kontrollgruppe 76,5 ($\pm 19,7$) Wochen. Insgesamt starben neun Patienten, bei ihnen lag das mittlere Überleben bei 23,8 ($\pm 22,1$) Wochen.

Obwohl auch hier keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, ist eine Tendenz zu erkennen. Sowohl bei der Betrachtung des gesamten Probandenkollektivs als auch bei der isolierten Betrachtung der Patienten mit KHK fiel auf, dass in der Gruppe mit einem PAT-Index von >2 kein Patient verstorben war. Im Gesamtkollektiv waren aus der Gruppe mit einem PAT-Index von $1,67-2,0$ insgesamt drei Patienten während des Follow-ups verstorben, die Gruppe mit der schlechtesten Endothelfunktion (PAT-Index $<1,67$) verzeichnete sechs Todesfälle. Diese Unterschiede sind jedoch nach statistischer Auswertung mittels log-Rank-Test mit einem p-Wert von 0,281 als nicht signifikant anzusehen.

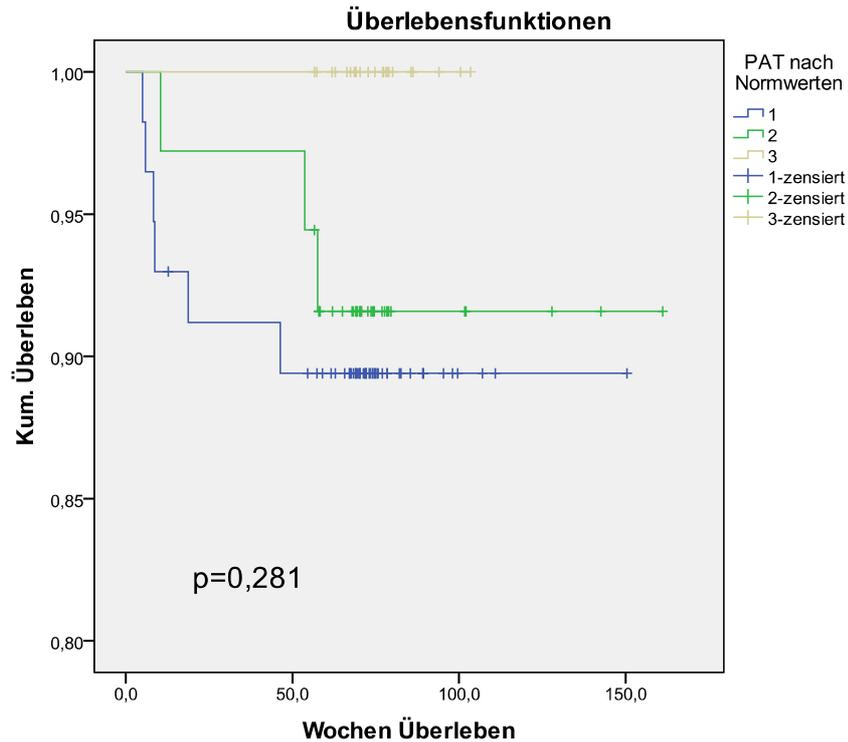


Abb. 20 Kaplan-Meier Analyse: Überleben in Wochen aller Probanden eingeteilt in drei Gruppen nach den Normwerten des PAT-Index

Ähnlich stellte sich die Situation bei isolierter Auswertung der Patienten mit KHK dar, hier verstarben zwei Patienten mit einem PAT-Index zwischen 1,67 und 2,0 während des Follow-up-Zeitraums. Die bereits erwähnten sechs verstorbenen Personen mit einem PAT-Index <1,67 gehörten alle zu den Patienten mit KHK. Auch dieser Unterschied besitzt nach Auswertung mit dem log-Rank-Test keine Signifikanz ($p=0,368$).

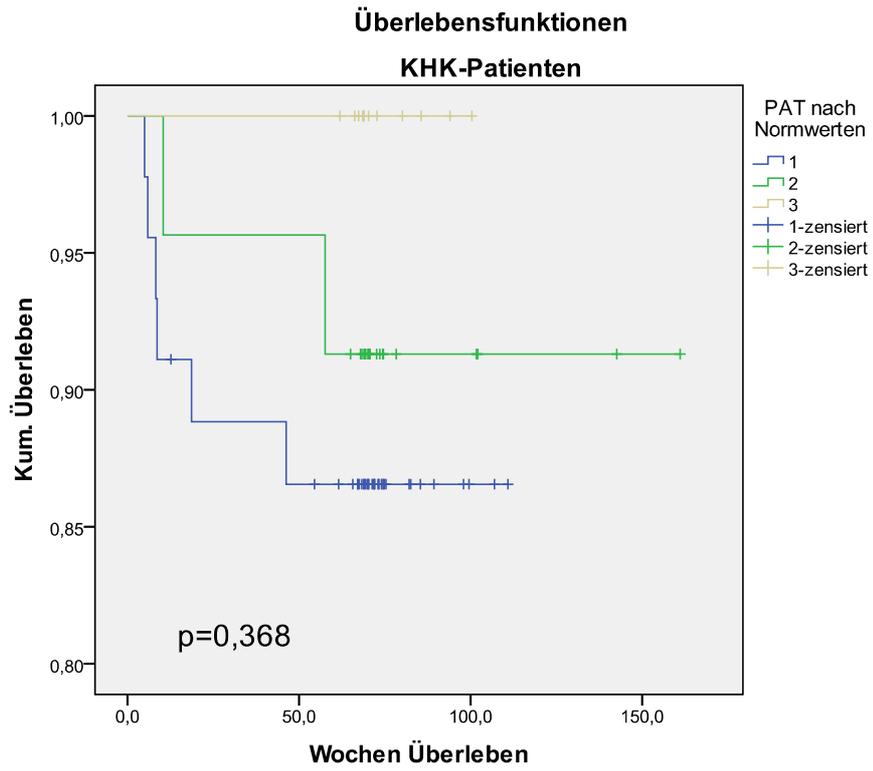


Abb. 22 Kaplan-Meier Analyse: Überleben in Wochen der Patienten mit KHK eingeteilt in drei Gruppen nach den Normwerten des PAT-Index

5. Diskussion

5.1 Die endotheliale Dysfunktion

Das Endothel besitzt vielfältige Aufgaben, unter anderem ist es für die Regulierung des Gefäßtonus verantwortlich. Neben der Beeinflussung über das vegetative Nervensystem wird diese Aufgabe vor allem über die unterschiedlich starke Produktion des Gefäßdilators NO wahrgenommen, welcher außerdem antiinflammatorische, antiproliferative und antithrombotische Eigenschaften besitzt. Der Terminus der endothelialen Dysfunktion ist hierbei durch eine geringere Bioverfügbarkeit dieses Moleküls gekennzeichnet und wird als ein Frühstadium der Atherosklerose angesehen.

Seit vielen Jahren ist die Rolle der Inflammation bei der Entwicklung der Atherosklerose gut verstanden. Ross prägte 1999 den Satz „Atherosclerosis is an inflammatory disease“ (14). Seitdem wurde wiederholt nachgewiesen, dass verschiedene Entzündungsmediatoren an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion maßgeblich beteiligt sind.

Verschiedene Methoden zur Messung der Endothelfunktion sind etabliert, welche im Einleitungsteil ausführlich dargestellt worden sind. Während Celermajer die FMD (siehe Abschnitt Einleitung) als Goldstandard zur Beurteilung der Endothelfunktion beschrieb, wird heute ebenfalls die in dieser Untersuchung verwendete Bestimmung des PAT-Index als allgemein etablierte Technik angesehen (39). Sie hat die Vorteile, dass sie schnell und einfach durchzuführen und weniger von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist. Dieses Verfahren wurde erstmals 2003 von Kuvin et al. untersucht, welcher feststellte, dass der PAT-Index und die sonografisch gemessene FMD miteinander korrelieren. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die gemessenen Werte auch mit dem Ausmaß der Niereninsuffizienz und dem Vorliegen einer KHK sowie verschiedenen Risikofaktoren assoziiert sind (47). Im Jahr 2004 untersuchte Bonetti et al. 94 Patienten ohne makroskopischen Nachweis einer KHK, wobei der PAT-Index signifikant niedriger bei Patienten mit mikrovaskulärer koronarer endothelialer Dysfunktion als bei Gesunden war. In dieser Untersuchung betrug die Sensitivität 80% und die Spezifität 85% bei einem PAT-Index von $<1,35$ für den Nachweis einer relevanten koronaren endothelialen Dysfunktion (49). Die klinische Bedeutung der RH-PAT-Methode wurde in den folgenden Jahren mehrfach untersucht. Haller et al. zeigte 2007, dass bereits bei Kindern mit Diabetes mellitus die Endothelfunktion gestört ist (51). In einer weiteren Studie wurden 42 Männer mit stabiler KHK untersucht und gezeigt, dass der PAT-Index einen geeigneten Parameter darstellt, um Risikogruppen von Patienten mit KHK zu stratifizieren. Weiterhin ist die Messung des PAT-Wertes zur Therapieüberwachung geeignet (77,78). In einer großen Studie von 2008 wurde an 1.957 Patienten der dritten Nachkommen-Generation der Framingham-Studie die Korrelation des PAT-Index mit den traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren erneut untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Korrelation zwischen gestörter endothelvermittelter Gefäßantwort und männlichem Geschlecht, dem Vorliegen von Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Außerdem fand sich eine Korrelation mit steigendem Alter, steigendem BMI sowie Serum-Cholesterinkonzentrationen.

Dagegen konnte für das Vorliegen von arterieller Hypertonie und erhöhter WHR kein Zusammenhang nachgewiesen werden, ebenso fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Vorliegen einer systemischen Inflammation, gemessen an der Konzentration des CRP im Serum (50).

Im Jahr 2010 konnten Rubinsthein und dessen Mitarbeiter erstmals einen signifikanten Zusammenhang mit dem kardiovaskulären Outcome und insbesondere der Mortalität nachweisen. Er rekrutierte insgesamt 270 Patienten und untersuchte die Endothelfunktion mittels Endo-PAT. Anschließend wurde die Patientenpopulation nach dem PAT-Index in zwei Gruppen aufgeteilt, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, in der es drei Gruppen gab (Grenzwert PAT-Index 0,4). In der in Abb. 22 dargestellten Überlebenskurve ist zu sehen, dass Patienten mit einem PAT-Index von mehr als 0,4 ein signifikant besseres Outcome aufweisen als Patientin mit einem niedrigeren PAT-Index (79).

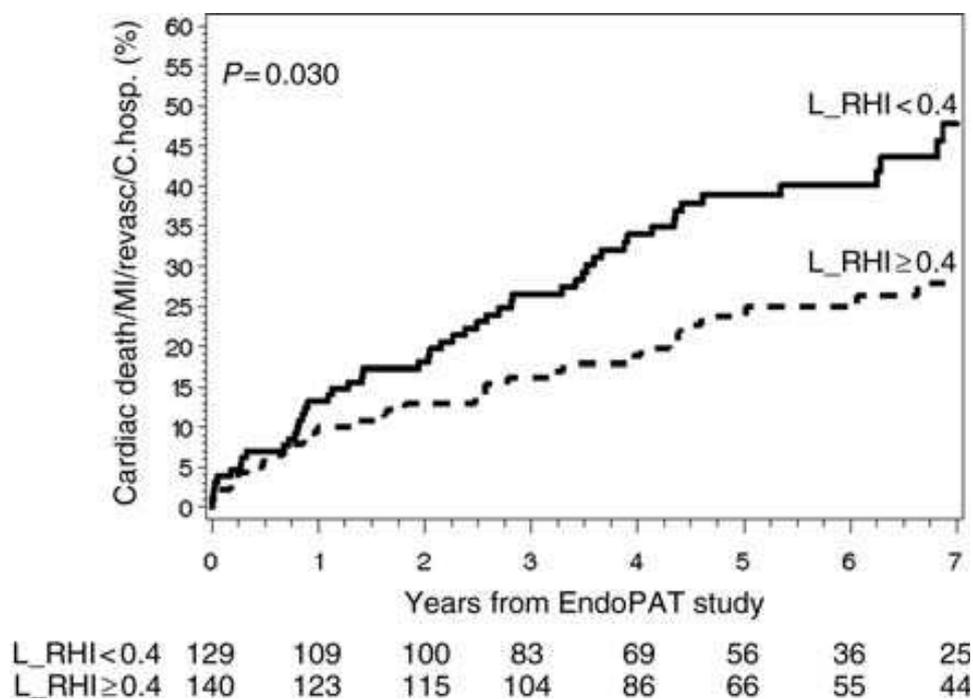


Abb. 22: Das kardiovaskuläre Outcome als Kombination von kardiovaskulärer Mortalität, Myokardinfarkt, koronarer Revaskularisationstherapie und erneuter Hospitalisation aus kardiovaskulärer Ursache bei Patienten mit hohem (>0,4) und niedrigem (<0,4) PAT-Index über einen Follow-up-Zeitraum von sieben Jahren nach Rubinshtein et al.;
L_RHI = natural logarithmic scaled reactive hyperemia index (aus 79)

Dies deckt sich nicht mit der in der vorliegenden Arbeit erstellten Kaplan-Meier-Analyse (siehe Abb. 20). Obwohl sich eine deutliche Tendenz abzeichnet, konnte kein signifikant besseres kardiovaskuläres Outcome für Patienten mit höherem PAT-Wert und damit nicht gestörter Endothelfunktion nachgewiesen werden (p=0,281).

Auf dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der PAT-Index unter anderem zum Nachweis einer potentiellen Assoziation mit proinflammatorischen Subgruppen der

Monozyten bei Patienten mit KHK untersucht. Leider konnte die von uns aufgestellte These durch die Untersuchungsergebnisse nicht untermauert werden. Es zeigte sich kein Zusammenhang der Monozytenpopulationen zur mittels RH-PAT gemessenen Endothelfunktion, weder für die Gesamtmonozyten noch für eine deren Subpopulationen (Tab. 11).

Im Folgenden sollen die im Resultate-Abschnitt präsentierten Daten auf dem Hintergrund der publizierten Literatur weiter diskutiert werden.

5.1.1 PAT-Index und Risikofaktoren

Beim Vergleich der verschiedenen Risikofaktorgruppen ist festzustellen, dass sowohl Patienten mit bestehender PAVK als auch solche mit stattgehabtem Myokardinfarkt eine gestörte Endothelfunktion hatten (Tab. 7). Dieses Ergebnis erscheint nachvollziehbar, da beide Variablen als Manifestationsform der endothelialen Dysfunktion bzw. Atherosklerose gelten. Dies ist von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits gezeigt worden.

Bei der Auswertung der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren fällt zunächst auf, dass ein signifikanter Zusammenhang nur für das Vorhandensein einer Dyslipoproteinämie besteht (Tab. 7). Ein solches Ergebnis wurde bereits bei Neunteufl 1997 beschrieben, allerdings wurde hier die endotheliale Dysfunktion mittels FMD untersucht (41). Kuvin et al. zeigte 2003 ebenfalls einen Zusammenhang zwischen PAT-Index und Dyslipoproteinämie (47), auch Hamburg et al. (2008) stellte einen Zusammenhang zur Cholesterin-HDL-Ratio fest (50).

In beiden Studien wurde ein signifikant reduzierter PAT-Index bei Männern gefunden, was sich nicht mit unseren Auswertungen deckt. Die fehlende Assoziation des Lebensalters mit dem PAT-Index steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, z.B. von Kuvin et al. (47). Auch hier zeigte sich bei der Untersuchung mit der RH-PAT-Methode eine Altersunabhängigkeit, während bei der Untersuchung mittels FMD die Endothelfunktion mit steigendem Alter signifikant niedriger war. Dies kann erklärt werden durch den Einbezug des Kontrollfingers bei der PAT-Messung (47), sodass individuelle Unterschiede, die bereits beim Ausgangswert bestehen, bei der Berechnung des Quotienten nicht mit als Effekt der reaktiven Hyperämie gewertet werden.

Unerwartet sind die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Assoziation der Marker der Adipositas im Patientenkollektiv. Bei Hamburg et al. ist eine negative Korrelation für den BMI beschrieben, jedoch keine Korrelation für die Waist-Hip-Ratio (50). In der vorliegenden Studie stellt sich das Ganze umgekehrt dar, es konnte keine Korrelation für den BMI gefunden werden, jedoch war bei der Korrelationsanalyse nach Pearson eine gestörte Endothelfunktion mit steigender WHR erkennbar (Tab. 8). Diese signifikante Korrelation trotz der geringen Fallzahl unterstreicht die Bedeutung dieses relativ jungen Risikofaktors in Prävention und Prognose der KHK.

Bei Hamburg et al. wurde eine reduzierte Endothelfunktion bei Diabetespatienten gefunden, dies deckt sich nur bedingt mit den vorliegenden Auswertungen (50). Mit einem p-Wert von 0,062 wird das Signifikanzniveau knapp verfehlt, wenn auch eine Tendenz zu erkennen ist (Tab. 7). Dieses Ergebnis

zeigt Übereinstimmung mit dem von Kuvin (47), der eine Tendenz zu einer gestörten Endothelfunktion bei Diabetikern beschreibt, die keine statistische Signifikanz erreichte.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass bei der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Publikationen von Hamburg und Kuvin enorme Unterschiede im Patientenkollektiv bestehen. Kuvin untersuchte gesunde Patienten, eine KHK stellte ein Ausschlusskriterium dar, sodass hier nur das Vorliegen der Risikofaktoren ohne manifeste Erkrankung Einfluss auf das Untersuchungsergebnis hatte. Die Studiengröße mit etwa 100 Patienten war vergleichbar mit der vorliegenden Studie. Bei Hamburg et al. dagegen wurden zwar Patienten mit KHK untersucht, aber die Anzahl der Patienten lag mit fast 2.000 deutlich über unserer Studiengröße. Aufgrund des heterogenen Patientenkollektivs unserer Studie, die sowohl Patienten mit klinisch manifester KHK in unterschiedlicher Ausprägung als auch koronargesunde Patienten einschließt, ist auch eine sehr viel größere Variabilität hinsichtlich der Beeinflussung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren zu erwarten. Weiterhin sollte nicht unerwähnt bleiben, dass in einer weiteren Arbeit von Bonetti 2004 zwar gezeigt wurde, dass Patienten mit einer reduzierten peripheren Endothelfunktion ein höheres Risiko einer koronaren, endothelialen Dysfunktion haben, aber bei diesen Patienten kein Zusammenhang zwischen Endothelfunktion und traditionellen Risikofaktoren gefunden wurde (49).

Im Laufe der zahlreichen Untersuchungen auf diesem Gebiet sind viele Grenzen der PAT-Methode festgestellt worden. Als erstes muss festgehalten werden, dass zwar eine blutflussinduzierte Vasodilatation durch die reaktive Hyperämie provoziert wird, diese aber nur indirekt gemessen wird. Es können nur Volumen- und Pulswellenveränderungen aufgezeichnet werden, nicht der Blutfluss als solcher. Weiterhin unterliegt diese Untersuchung einer Artefaktanfälligkeit. Dem liegt insbesondere zu Grunde, dass die Untersuchung am Finger durchgeführt wird, dessen Hautschicht sehr gut innerviert ist und damit besonders dem Einfluss des vegetativen Nervensystems unterliegt.

Es wurde versucht, diesen Einfluss in der vorliegenden Studie so minimal wie möglich zu halten, indem die Patienten unter standardisierten Bedingungen morgens nüchtern und in Ruhe in einem abgedunkelten Raum untersucht wurden. Individuelle systemische Einflüsse werden durch Einbeziehung des Kontrollfingers bei dieser Methode minimiert (48,49).

Die mittels der RH-PAT-Methode gemessene Endothelfunktion war in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit KHK signifikant reduziert, ein Sachverhalt, der die aktuelle Datenlage widerspiegelt (Abb. 16).

5.1.2 PAT-Index und Laborparameter

In der vorliegenden Studie konnte von allen gemessenen Routinelaborparametern ein signifikanter Zusammenhang nur für den Retentionsparameter Kreatinin festgestellt werden ($p=0,021$). Hier ergab

sich eine negative Korrelation nach Pearson. Für den Harnstoff und insbesondere für die GFR konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, wobei beide Parameter von zusätzlichen Faktoren abhängig sind (Tab. 10). Auf den Zusammenhang zwischen Nierenfunktion und dem Auftreten von kardiovaskulären Krankheitsmanifestationen wird im unteren Abschnitt eingegangen. Es ist unumstritten, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein deutlich höheres kardiovaskuläres Risiko haben (74). In Analogie zu deren Korrelation mit dem PAT-Index war die Kreatinin-Konzentration bei den Patienten mit KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher (Tab. 3). Auch die Höhe der GFR korreliert in der vorliegenden Studie nicht mit der Endothelfunktion, was den Ausführungen von Chang et al. 2010 (80) widerspricht, der auch diesen Marker als unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten einer KHK beschreibt. Ein besserer Marker zur Beurteilung der Endothelfunktion ist nach neuerer Literatur jedoch der Nachweis einer Mikroalbuminurie bzw. der Albumin-Kreatinin-Ratio im Spontanurin (ACR). Bereits 1989 wurde von Deckert et al. die „Steno-Hypothese“ begründet, der zufolge eine Mikroalbuminurie, v.a. bei Diabetikern, eine Folge des Verlustes von negativen Ladungen in Form von Heparansulfaten an der Gefäßwand ist und ein geeignetes Anzeichen für eine generalisierte endotheliale Dysfunktion darstellt (81). Pathophysiologisch geht man außerdem davon aus, dass durch die geringere Bioverfügbarkeit von NO und der damit verbundenen endothelialen Dysfunktion die Permeabilität des Endothels zunimmt. Dies hat Auswirkungen besonders auf das Endothel der Nierenglomeruli, sodass eine Mikroalbuminurie entsteht. In einer Studie von Mohan et al. 2008 wurde an diabetischen Mäusen nachgewiesen, dass es bei einer Ausschaltung der eNOS zu einem signifikanten Anstieg der Albuminausscheidung im Urin kommt (82). In einer Studie mit 432 Patienten aus dem Jahre 2001 wird erstmals von der ACR als Parameter der endothelialen Dysfunktion gesprochen, hier wurde eine Assoziation mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten nach Myokardinfarkt nachgewiesen. Der Anstieg der Ratio ist in den ersten Tagen nach Infarkt mit dem Auftreten einer vorübergehenden Herzinsuffizienz erklärt worden, später durch die endotheliale Dysfunktion am Glomerulus (83). Im Jahr 2010 wurde an einer Studie mit 1.369 nieren- und koronargesunden Patienten gezeigt, dass die Höhe der ACR mit der sonografisch gemessenen Carotis-Intima-Dicke assoziiert ist (84). Weiterhin wurde eine Korrelation zum kardiovaskulären Outcome nachgewiesen, welche bereits unter dem allgemein als pathologisch angesehenen Referenzwert von 30 mg/g Kreatinin beginnt (85). In unserer Studie konnte keine Assoziation zur Endothelfunktion aufgedeckt werden, weder für die isolierte Mikroalbuminurie noch für die ACR im Spontanurin. Das Signifikanzniveau wird in der vorliegenden Untersuchung nicht erreicht (Tab. 10). Kathiresan kommt 2006 jedoch zum gleichen Ergebnis wie unsere Studie, auch er findet keine Korrelation von Mikroalbuminurie und endothelialer Dysfunktion (gemessen mittels FMD). Eine potentielle von den Autoren genannte Erklärung ist, dass die ACR womöglich ein Parameter zur Aufdeckung einer mikrovaskulären Dysfunktion ist, die mit der FMD von Arterien nicht messbar ist (86).

Im Weiteren soll auf die Parameter des Lipidstoffwechsels eingegangen werden, wobei für keinen der vier Routineparameter ein Zusammenhang mit der Endothelfunktion nachgewiesen werden konnte. Beim Gesamtcholesterin kann mit einem p-Wert von 0,057 von einer deutlichen Tendenz zur Korrelation der Parameter gesprochen werden, auch HDL-C mit $p=0,080$ zeigt eine tendenzielle Korrelation (Tab. 10). Die Rolle des Cholesterins und speziell des LDL-C bei der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und einer Atherosklerose wurde im Abschnitt Einleitung ausführlich dargestellt. Es gibt leider bisher wenige Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Lipidstoffwechselfparametern und PAT-Ratio. Bei Hamburg et al. (50) korrelierte nur die Gesamtcholesterin-HDL-Ratio mit dem PAT-Index, bei Rubinshtein nur das HDL-C (79). Hamburg et al. stellten weiterhin fest, dass Patienten, die unter einer Statintherapie stehen, eine bessere Endothelfunktion bei der Endo-PAT-Messung haben. Da 67% der Probanden dieser Studie sich einer solchen Therapie unterzogen, ist es möglich, dass unter dem medikamentösen Einfluss vor allem der Einfluss des Gesamtcholesterins und des LDL-C auf das Endothel nicht mehr nachweisbar ist. Misst man die Endothelfunktion mittels FMD, so finden sich mehrere Studien, die den Zusammenhang zu Lipidstoffwechselstörungen anzeigenden Laborparametern untersuchen. Angefangen 1997 mit Neunteufl et al., die zeigen konnten, dass die FMD sowohl mit dem PAT-Index als auch mit dem Serum-Gesamtcholesterin korreliert (41), zeigen neuere Studien eine negative Korrelation vor allem für die Gesamtcholesterin-HDL-Ratio zur FMD (87,88). Letztere stellten eine negative Korrelation auch für die Triglyceride fest, welche in den vorliegenden Analysen jedoch in keinem erkennbaren Zusammenhang mit der Endothelfunktion standen (Tab. 10).

Das BNP als natriuretisches Peptid hat einen vasodilatatorischen Effekt, indem es an Rezeptoren angreift, die über die cGMP-Kaskade die eNOS aktivieren und so die Bioverfügbarkeit von NO steigern. Ein weiterer Stoffwechselweg führt über die Öffnung von Kalium-Kanälen (89,90). Eine negative Korrelation zwischen natriuretischen Peptiden und FMD wurde bei Chong et al. nachgewiesen, hier bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (91). Kathiresan et al. konnten diesen Zusammenhang, ebenso wie in den vorliegenden Daten, nicht zeigen (86). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Vorhandensein einer chronischen Herzinsuffizienz meist sowohl mit erhöhten BNP-Werten als auch einer gestörten Endothelfunktion einhergeht. Die Erhöhung dieser beiden Parameter könnte also bei Chong durchaus zu finden sein, die Werte stehen aber in keinem Kausalzusammenhang zueinander. Studien zum Zusammenhang der natriuretischen Peptide mit dem PAT-Index gibt es bisher nicht.

Die Bedeutung des CRP in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion ist unumstritten. Als Marker einer systemischen Inflammation ist eine Erhöhung des CRP mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung verbunden (14). Bei Patienten mit ACS ist es mit einer erhöhten Reinfarkt- sowie Mortalitätsrate verbunden, außerdem korreliert es mit der Komplikationsrate bei Koronarinterventionen (7). Albert et al. zeigten einen Zusammenhang mit dem Framingham-Risk-Score und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (92). Das CRP hat

verschiedene Einflüsse auf das Endothel, neben einer komplementaktivierenden Wirkung induziert es die Expression von Adhäsionsmolekülen und steigert die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen sowie deren Differenzierung zu Schaumzellen (93). Ein weiterer pathogenetischer Mechanismus ist die modulierende Einwirkung des CRP auf die Expression von Tetrahydrobiopterin (BH₄), einem Kofaktor der eNOS (94). Der Einfluss des CRP auf die Endothelfunktion wurde in mehreren Studien der letzten Jahre bestätigt, allerdings ist in all diesen Studien die Endothelfunktion mittels FMD gemessen worden (95). Widersprüchliche Ergebnisse zeigten sich bei Vita et al., die eine Studie mit 1.903 Patienten durchführten und eine Korrelation zwischen erhöhtem CRP und gestörter Endothelfunktion zeigen konnten, die jedoch nach Adjustierung für traditionelle Risikofaktoren nicht mehr nachzuweisen war (96). In einer Studie aus dem Jahr 2006 wurde bereits eine schlechtere Endothelfunktion mittels FMD bei adipösen Kindern im Vergleich zu gesunden Kindern nachgewiesen, diese korrelierte ebenfalls mit der Höhe des gemessenen Serum-CRP (97). Eine Therapie mit Statinen und die antiinflammatorische Wirkung der Acetylsalicylsäure (ASS) senken den CRP-Spiegel und verbessern die Endothelfunktion (98). In den vorliegenden Analysen konnte keinerlei Korrelation der Endothelfunktion mit dem CRP-Spiegel nachgewiesen werden (Tab. 10). Dieses Ergebnis steht im Einklang zu den Ergebnissen von Hamburg et al., welche ebenfalls die EndoPAT-Methode benutzten, auch diese fanden keine Korrelation zum CRP. Möglicherweise liegen die Gründe in der vorliegenden Studie in der Beeinflussung des Endothels durch Statin- und ASS-Medikation der betreffenden Patienten. Außerdem könnte der Einbezug des Kontrollfingers ebenso wie bei der Altersabhängigkeit den Einfluss der systemischen Inflammation minimieren. Dies würde erklären, warum die Endothelfunktion nur bei Messung mit der RH-PAT-Methode nicht korreliert, bei der FMD-Messung jedoch schon.

Die Zellpopulationen des Differentialblutbildes wiesen in der vorliegenden Studie keine Korrelation zur Endothelfunktion auf, weder die Gesamtleukozyten noch deren Subpopulationen (Tab. 10). Ihre Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose wurde bereits dargestellt, jedoch finden sich nur wenige Studien, die deren Zusammenhang mit der FMD bzw. dem PAT-Index untersuchten. Ein Zusammenhang zwischen Gesamtleukozyten und Endothelfunktion wurde 2002 mittels FMD untersucht und bestätigt, allerdings in einer Population von Patienten mit Diabetes mellitus (99). Im Jahr 2005 wurde dieser Zusammenhang in einer Studie mit 868 Patienten ein weiteres Mal verifiziert (100). Van Ostrom zeigte 2003, dass ein Anstieg der Gesamtleukozyten und der neutrophilen Granulozyten mit einer verminderten FMD unter dem Einfluss einer postprandialen Lipidämie und Glucosämie einhergeht (101). So scheinen also vor allem die neutrophilen Granulozyten Einfluss auf die Endothelfunktion zu nehmen, was den inflammatorischen Einfluss bei der Pathogenese der Atherosklerose unterstreicht. Es gibt eine weitere Studie von 2010, welche eine Assoziation der Endothel-abhängigen Vasodilatation mit der Höhe der Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten zeigt. Die Endothelfunktion wurde hier jedoch mit intrabrachialer Ach-Injektion gemessen (102). Zum PAT-Index wurden diesbezüglich noch keine Untersuchungen angestellt.

5.1.3 Endotheliale Dysfunktion und Medikamenteneinnahme

Einen signifikanten Einfluss auf die mittels RH-PAT-Index gemessene Endothelfunktion hatte in unserer Studie nur die Einnahme von ACE-Hemmern und Aldosteronantagonisten (Abschnitt 4.2.2). Das Angiotensin converting enzym (ACE) fördert die Umwandlung des Angiotensin I in das vasokonstriktorisch wirkende Angiotensin II. Eine Hemmung des ACE sollte mit einer verbesserten Endothelfunktion einhergehen (103), allerdings fand sich in unserer Studienpopulation bei den mit ACE-Hemmern behandelten Patienten eine gestörte Endothelfunktion. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch eine ACE-Hemmung ein dilatierter Grundtonus der Arterien besteht, der auf die reaktive Hyperämie nicht mehr so stark mit einer weiteren Vasodilatation reagiert. Außerdem muss festgehalten werden, dass der Anteil von mit ACE-Hemmern behandelten Patienten signifikant höher in der KHK-Gruppe als in der Kontrollgruppe war, so dass eine schlechtere Endothelfunktion in dieser Gruppe zu erwarten ist (Tab. 5). Allerdings wirft dieser Umstand die Frage auf, warum es keine Korrelation mit der Endothelfunktion bei der Einnahme von Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten, die über die Hemmung der Wirkung des Angiotensin II wirken, gibt. Für Irbesartan beispielsweise konnte eine solche bereits nachgewiesen werden (104). Am Wahrscheinlichsten liegt dies in der geringen Anzahl der mit dieser Medikamentengruppe behandelten Patienten in der vorliegenden Untersuchung. Die zweite Medikamentengruppe, deren Einnahme in unserer Studie mit der Endothelfunktion korreliert, ist die der Aldosteronantagonisten. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus früheren Studien, welche den günstigen Einfluss von Eplerenon und Spironolacton auf die Endothelfunktion untersucht haben, wobei in diesen Untersuchungen die Endothelfunktion mittels FMD untersucht worden war (105,106). Dass Aldosteron die Endothelfunktion verschlechtert und eine Bedeutung bei der Atheroskleroseentstehung besitzt, ist seit längerem bekannt, der Mechanismus ist jedoch nicht abschließend geklärt (107).

Erstaunlicherweise findet sich in unserem Patientenkollektiv ebenfalls keine Korrelation der Endothelfunktion zur Einnahme einer lipidmodulierenden Therapie. Bezugnehmend auf die JUPITER-Studie von 2008 und weitere Studien, die den Einfluss vor allem der Statine (Rosuvastatin, Simvastatin) auf das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und die FMD untersucht haben, wäre ein Zusammenhang auch in unserem Kollektiv zu erwarten (108,109). In der JUPITER-Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit KHK auch ohne Hypercholesterinämie von einer Statintherapie profitieren, hier verbessern Statine das kardiovaskuläre Outcome über eine Senkung des erhöhten hochsensitiven CRP (hs-CRP) (110). Bei Hamburg et al. wurde die Endothelfunktion mittels RH-PAT untersucht, und auch hier wurde eine verbesserte Endothelfunktion unter Statintherapie gezeigt. Dieser Effekt ist in unserer Studie womöglich verschwunden, da eine Statintherapie bevorzugt bei Patienten mit KHK und somit gestörter Endothelfunktion vorgenommen wurde.

5.2 Die Monozyten-Subpopulationen

Die Einteilung der Monozyten in verschiedene Subpopulationen wurde erstmals vor etwa 20 Jahren von Passlick et al. vorgenommen (55). Er beschrieb eine Monozytenheterogenität beruhend auf der unterschiedlichen Expression ihrer Oberflächenmarker CD14 (LPS-Rezeptor) und CD16 (FcγIII-Rezeptor). Das CD16-Oberflächenmolekül war bis dahin nur als Oberflächenmarker von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bekannt, die von ihm gefundenen CD16-positiven Zellen ließen sich jedoch anhand Morphologie und des Fehlens von NK-Zell-spezifischen Markern eindeutig der Monozytenpopulation zuordnen. Im Vergleich zu den klassischen CD16-negativen Monozyten besitzen sie mehr MHCII-Moleküle und zeigen weniger Phagozytoseaktivität, sie scheinen daher eine Funktion als Antigen-präsentierende Zellen (APC) zu besitzen. Sie exprimieren außerdem deutlich weniger CD33 und ähneln den Alveolarmakrophagen der Lunge, sodass davon ausgegangen wird, dass es sich bei den CD16-positiven Zellen um eine reifere Monozytenpopulation handelt, deren Differenzierung aus den klassischen Monozyten durch M-CSF und TNFγ induzierbar ist (55,64).

Der Nachweis einer vermehrten Zytokin-Produktion der CD16-positiven Monozyten führte zu deren Bezeichnung als pro-inflammatorische Monozyten. Es wurde eine hohe Produktion von TNF-α, IL-1 und IL-6 im Vergleich zu den klassischen Monozyten gefunden. Dagegen konnte keine Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen werden (57,111,112).

Der eher geringe Anteil der CD16-positiven Monozyten kann unter bestimmten Bedingungen enorm ansteigen. So wurden beispielsweise stark erhöhte Level bei septischen Patienten gefunden. Auch unter dem Einfluss von anderen inflammatorischen, infektiösen oder nicht-infektiösen Erkrankungen finden sich Erhöhungen des prozentualen Anteils dieser Zellpopulation, wie bei Patienten mit HIV, Tuberkulose sowie malignen oder Autoimmun-Erkrankungen. Diese können unter immunsuppressiver Therapie wieder Normalwerte annehmen. Auch bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie wurden abnorme Monozytenverteilungen gefunden (113).

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Betrachtung der Monozyten-Subpopulationen ist die Expression von verschiedenen Chemokinrezeptoren, die eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Atherosklerose spielen. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang die Rezeptoren CCR2, CCR5 und CX3CR1. Die unterschiedliche Ausprägung dieser Moleküle auf den Monozytenarten ließ letztendlich die Notwendigkeit aufkommen, die Einteilung der CD16-positiven in zwei weitere Subpopulationen vorzunehmen, die CD14⁺⁺/CD16⁺ und CD14⁺/CD16⁺-Monozyten. Diese Einteilung in drei Subpopulationen findet sich erstmals 2003 bei Ancuata et al. und wird seit 2010 als Standard in der Monozytennomenklatur betrachtet (114).

Das CCR2-Molekül wird hauptsächlich von CD14⁺⁺/CD16⁺-Monozyten exprimiert und fungiert als Rezeptor für das MCP-1 (monocyt-chemoattractant-protein 1) (114,115). Auch auf 70% der CD14⁺⁺/CD16⁺-Monozyten findet sich dieser Rezeptor. Das MCP-1 ist ein Chemokin, welches von

Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert wird, nachdem diese Kontakt mit oxidierten Lipoproteinen hatten. Die Monozyten, die diesen Rezeptor besitzen, haben eine hohe Affinität zu den MCP-1-produzierenden Zellen und werden also nach dem Kontakt mit oxLDL zum Ort der Läsion rekrutiert. Damit sind sie direkt an der Frühphase der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque beteiligt. In einer Studie mit Mäusen zeigte sich bei Ausschaltung des CCR2 ein deutlich verringertes Risiko für die Entstehung einer Intimahyperplasie (115).

Ein weiteres bedeutendes Molekül ist das CCR5, welches hauptsächlich auf CD14⁺⁺/CD16⁺Monozyten exprimiert wird. Dessen Ligand ist das Chemokin RANTES (**R**egulated upon **A**ctivated **N**ormal **T**-Cell **E**xpressed and **S**ecreted), welches ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Plaques zu spielen scheint. Nach Ausschaltung des CCR5 konnte eine deutliche Verlangsamung der atherosklerotischen Plaqueprogression bei Mäusen nachgewiesen werden (116), so dass es wahrscheinlich einen Einfluss in den späteren Stadien der Plaqueentstehung und -progression besitzt.

Am wichtigsten im Zusammenhang mit der Atheroskleroseentwicklung ist das CX3CR1-Molekül. Dieses ist am stärksten auf CD14⁺/CD16⁺Monozyten ausgeprägt, findet sich aber auch auf T-Lymphozyten und NK-Zellen. Sein Ligand ist Fraktalkine, welches vorrangig von Endothelzellen unter dem Einfluss inflammatorischer Bedingungen, wie dem Einwirken von IL-1 oder TNF- α , gebildet wird (117). Es stellt seinerseits ein Zytokin dar und besitzt eine Chemokindomäne, die eine Affinität zum CX3CR1 besitzt. Es werden somit vorrangig CD14⁺/CD16⁺Monozyten zum Ort des inflammatorischen Geschehens rekrutiert, diese sind dort am Aufbau der atherosklerotischen Läsion beteiligt (74).

Anfangs wurden nur zwei Subpopulationen von Monozyten unterschieden, die CD16-positiven und die CD16-negativen Monozyten. Erst seit 2003 ist von drei verschiedenen Populationen die Rede (100). Die CD16-positiven Monozyten machen in allen dazu veröffentlichten Publikationen den weitaus kleineren Anteil der Gesamtmonozyten aus. In den meisten Studien wird von einem Anteil von 5-10% gesprochen (55,64,111,114,118). Im Gegensatz dazu fanden sich bei den vorliegenden Untersuchungen relativ gleichmäßig verteilte Anteile: der Anteil der CD14⁺⁺/CD16⁻Monozyten lag bei 39,3%, der CD14⁺⁺/CD16⁺ bei 35,2%, und von CD14⁺/CD16⁺ bei 25,6% (Tab. 6). Dies widerspricht den meisten der publizierten Analysen, wobei erwähnt werden muss, dass sich die Verteilungen aus den aktuellen Veröffentlichungen größtenteils auf gesunde Probandenpopulationen oder Patienten mit Niereninsuffizienz beziehen (74,119), während bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten Patienten in den meisten Fällen eine gesicherte KHK vorlag. Da jedoch zwischen Patienten mit KHK und Kontrollgruppe hinsichtlich der Monozytenverteilungen keine signifikanten Unterschiede in der vorliegenden Untersuchung zu finden waren, ist das hier dargestellte Ergebnis damit nicht erklärbar.

Auch durch eine unterschiedliche Definition der einzelnen Regionen bei der FACS-Analyse können Schwankungen hervorgerufen werden, die jedoch kein solches Ausmaß annehmen sollten. Bei der verwendeten Methode der FACS-Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD14 und CD16-Moleküle handelt es sich um ein etabliertes Standardverfahren, allerdings wurde im Gegensatz zu den erwähnten Studien zusätzlich ein CD86-Ak verwendet, um die Gesamtmonozyten als eigenständige Population vor der Analyse der Subpopulationen von den anderen Zellen des Blutes abzugrenzen. Dadurch können ebenfalls Schwankungen hervorgerufen werden, da hier mehr Zellen in die Analyse einbezogen werden, die ohne diesen Antikörper der Gruppe der Lymphozyten zugerechnet werden könnten. Erst Ulrich et al. verwendeten im Jahr 2006 ebenfalls diesen zusätzlichen Antikörper, doch auch hier wird nur von einem Anteil von 10-20% der CD16+Monozyten ausgegangen (73).

5.2.1 Monozytensubpopulationen bei Patienten mit KHK

Monozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der KHK (siehe Abschnitt Einleitung). Da die besondere Rolle der pro-inflammatorischen CD16+Monozyten bei der Entstehung der Atherosklerose als inflammatorische Gefäßreaktion im Zentrum dieser Arbeit steht, soll nun auf die Verteilung dieser Subpopulation im Patientenkollektiv eingegangen werden. In einer Studie von Schlitt et al. 2004 mit etwa 250 Patienten wurde dieser Zusammenhang erstmalig gezeigt (65). Es wurden im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv signifikant erhöhte CD16+Monozyten bei Patienten mit prävalenter KHK gefunden, dieses Ergebnis blieb auch nach Adjustierung für mögliche einflussreiche Risikofaktoren bestehen, wobei in dieser Arbeit nur der relative Anteil der Zellpopulationen analysiert worden war.

In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2012 (Rogacev et al.) wurde dieser Sachverhalt erneut aufgegriffen und die Verteilung der drei Subpopulationen bei 951 Patienten untersucht, die zur elektiven Durchführung einer Koronarangiografie aufgenommen worden sind. Es wurden dabei die drei Monozyten-Subpopulationen analog zur Vorgehensweise bei den hier vorliegenden Untersuchungen laborchemisch ermittelt und anschließend in Quartile aufgeteilt. Nach einem mittleren Zeitraum von 2,6+1 Jahren wurde das Follow-up durchgeführt und hinsichtlich der Monozytenzahlen verblindet ausgewertet. Man kam zu dem Ergebnis, dass die CD14++/CD16+Monozyten als einzige der Subpopulationen nach Adjustierung für klassische und nicht-klassische Riskofaktoren eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen aufweisen. Als primärer, kombinierter Endpunkt galt hierbei das Auftreten eines kardiovaskulären Todes, eines akuten Myokardinfarktes und eines nicht-hämorrhagischen Schlaganfalls (120).

Eine weitere aktuelle Studie aus dem Jahr 2012 mit insgesamt 700 Probanden, wobei eine prävalente KHK ein Ausschlusskriterium darstellte, identifizierte die klassischen CD16-negativen Monozyten als Prädiktor für das Risiko von kardiovaskulären Ereignissen. Dieses Ergebnis deckt sich am ehesten mit

unseren Resultaten, wobei jedoch darauf hingewiesen werden muss, dass diese Untersuchung an Zellen durchgeführt worden sind, die zum Teil über mehrere Jahre bei -140°C eingefroren waren. Eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Umstand ist nicht auszuschließen (121).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind zum Teil widersprüchlich. Die Werte der Gesamtmonozyten sind zwar im KHK-Kollektiv signifikant erhöht (im Vergleich zur Kontrollgruppe), bei der Aufteilung in die drei Subpopulationen verschwindet diese Korrelation jedoch. Insbesondere bei den im Rahmen unserer Betrachtungen wichtig erscheinenden $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^{+}$ und $\text{CD14}^{+}/\text{CD16}^{+}$ Monozyten gibt es keine Unterschiede zwischen Patienten mit KHK und gesunden Personen. Erstaunlicherweise findet sich ein solcher Unterschied nur für die klassischen CD16^{-} negativen Monozyten, analog zu den Ergebnissen von Berg et al. (121). Bei der Betrachtung der Absolutzahlen zeigen sich signifikant erhöhte CD16^{-} negative Monozyten bei den Patienten mit KHK (251 vs. 157, $p=0,007$). Für die CD16^{+} positiven Monozyten konnte kein relevanter Unterschied zwischen Gesunden und Patienten mit KHK festgestellt werden. Jedoch lässt sich bei der Population der $\text{CD14}^{+}/\text{CD16}^{+}$ Monozyten eine eindeutige Tendenz erkennen. Sie sind deutlich höher bei Patienten mit KHK, jedoch wird die Grenze zur statistischen Signifikanz nicht erreicht (174 vs. 141, $p=0,058$). Auch bei den $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^{+}$ Monozyten sind die absoluten Zahlen höher bei Patienten mit KHK, aber auch hier ohne statistische Signifikanz (229 vs. 199, $p=0,259$) (Tab. 6). Bei der Auswertung der relativen Zahlen konnte für keine der drei Monozytensubpopulationen ein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gefunden werden. Diese von der aktuellen Datenlage abweichenden Ergebnisse stehen sicherlich im Zusammenhang mit der ebenfalls abweichenden prozentualen Verteilung der Monozyten-Subpopulationen in unserem Kollektiv. Auch hier konnten einige mögliche Ursachen gefunden werden. So wurde wie bereits erwähnt die Gesamtpopulation der Monozyten durch den CD86 -AK vorselektiert, was bei Schlitt et al. nicht geschehen ist, so dass hier wahrscheinlich ein tendenziell höherer Anteil an CD16^{+} Monozyten gemessen wurde. Außerdem wurde bei Schlitt et al. die Einteilung der CD16^{+} Monozyten in deren zwei Subpopulationen nicht vorgenommen, was heute als Standardmethode angesehen wird. Bei der Rekrutierung unserer Kontrollgruppe stellte zwar das Vorhandensein einer KHK ein Ausschlusskriterium dar, dennoch wurde ein Großteil im Rahmen eines stationären Aufenthaltes rekrutiert, so dass man den Einfluss einer anderen systemischen Erkrankung auf die Monozytenverteilung nicht ausschließen kann.

Rogacev et al. führten 2009 eine weitere Studie zur Bedeutung der Monozytenheterogenität durch (Teil der I LIKE HOME Studie: „Inflammation, Lipid Metabolism and Kidney Disease in Early Atherogenesis - The Homburg Evaluation“). In ihrem Patientenkollektiv befanden sich 569 gesunde Patienten, deren Monozytenverteilung mittels FACS-Analyse untersucht wurde. Hier wurde wie in der vorliegenden Studie ein CD86 -Ak zur Abgrenzung der Gesamtmonozyten benutzt und die Einteilung in drei Subpopulationen vorgenommen. Es fand sich, ebenfalls im Widerspruch zu unseren Ergebnissen stehend, die gängige Verteilung, bei der die CD16^{+} Monozyten etwa 10% der Gesamtmonozyten darstellen, in diesem Fall 17%. Es wurde die Korrelation der CD16^{+} Monozyten

mit einer subklinischen Atherosklerose, definiert durch die sonografisch gemessene Dicke der Carotis-Intima, und einer vorhandenen Adipositas, definiert durch den BMI und die WHR, untersucht. Für beide Parameter fand sich eine eindeutige Korrelation nur für die CD16+positiven, besonders die CD14+/CD16+Monozyten, nicht aber für die Gesamtmonozyten (119). Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der pro-inflammatorischen Monozytenpopulation bei der Entstehung der Atherosklerose.

Tab. 12 Vergleich der relativen Monozytenverteilungen in verschiedenen Studienpopulationen

	Vorliegende Studie		Schlitt et al. 2004		I LIKE HOMe 2009	Berg et al. 2012	
	Patienten	Gesunde	Patienten	Gesunde		Mit CV- Ereignis	Ohne CV- Ereignis
N	114		247	61	569	123	536
Mo1 (%)	40,4	36,6	86,4	88,6	83,1	69	67
Mo2 (%)	34,5	36,9	13,6	11,4	4,1	3,6	3,5
Mo3 (%)	25,1	26,7			12,8	6,7	7,1
p-Wert	0,047	0,474	<0,001				

CV-Ereignis: kardiovaskuläres Ereignis

Tab.13 Vergleich der Absolutzahlen der Monozytensubpopulationen in verschiedenen Studienpopulationen (vorliegende Studie, gesunde Patienten, Dialysepatienten)

	Vorliegende Studie		I LIKE HOMe	Rogacev et al. 2009		Berg et al. 2012	
	Patienten	Gesunde		Mit CV- Ereignis	Ohne CV- Ereignis	Mit CV- Ereignis	Ohne CV- Ereignis
N	108		569	70		123	536
Mo1/μl	251	157	405	417	494	344	297
Mo2/μl	229	199	20	27	37	19	17
Mo3/μl	174	141	60	119	158	34	32

CV-Ereignis = kardiovaskuläres Ereignis

5.3 Endothelfunktion und Monozytensubpopulationen

Der von uns erwartete Zusammenhang von endothelialer Dysfunktion und Erhöhung der CD16-positiven Monozyten im Blut konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden (Tab. 11). Anhand der Ergebnisse aus vorliegenden Untersuchungen, die wiederholt die Rolle der Inflammation und in diesem Rahmen besonders die der proinflammatorischen Monozytensubpopulation bei der

Entstehung der Atherosklerose bestätigt haben, wurde die dieser Promotion zu Grunde liegende Hypothese aufgestellt, dass proinflammatorische Monozyten eine Schädigung des Endothels hervorrufen bzw. unterhalten und dieser Zusammenhang sich in einer Korrelation mit den gemessenen PAT-Indices widerspiegelt. Diese Annahme wurde durch Ergebnisse aus Studien erhärtet, die feststellten, dass die endotheliale Dysfunktion eine Schlüsselfunktion bei der Pathogenese der Atherosklerose einnimmt und bereits vor deren klinischer Manifestation nachweisbar ist. Im Rahmen der in dieser Promotionsarbeit präsentierten Untersuchungsreihe zeigte sich keine Assoziation der CD16-positiven Monozyten mit der Endothelfunktion, gemessen mittels RH-PAT-Index, weder im gesamten Probandenkollektiv noch bei isolierter Betrachtung der Patienten mit KHK oder bei Betrachtung der beiden Unterformen der CD16+ Monozyten (Mo2 und Mo3) (Abb. 17, 18, 19).

Bei der Untersuchung der Monozytenpopulation fällt auf, dass die prozentuale Verteilung der verschiedenen Subpopulationen nicht mit den Ergebnissen des überwiegenden Anteils der Publikationen übereinstimmt. Es fand sich eine relativ gleichmäßige Verteilung aller Subpopulationen, statt -wie erwartet- etwa 80% CD16-negative und 20% CD16-positive Monozyten. Abweichungen von den meisten bisher veröffentlichten Studien hinsichtlich prozentualer Verteilung der Subpopulationen finden sich jedoch bei Berg et al., einer der aktuellsten Studien zu diesem Thema. Hier fanden sich etwa 70% CD16-negative Monozyten, ein Ergebnis, welches sich den hier präsentierten Resultaten annähert. Diese ist jedoch, wie bereits angedeutet, kritisch zu beurteilen, da es sich zum großen Teil um gefrorene Zellen handelt.

Da es bis heute keine veröffentlichte Studie gibt, die den Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Monozyten und Endothelfunktion untersucht, weder mittels RH-PAT-Methode noch mittels FMD, ist hier ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen an größeren Studienpopulationen zu sehen.

5.4 Das Risikofaktorprofil im Patientenkollektiv

Abschließend ist zu erwähnen, dass sich das vorliegende Patientenkollektiv aus einer Patientengruppe mit gesicherter KHK und einer Kontrollgruppe, bestehend aus koronargesunden Patienten, zusammensetzt. Bei der Betrachtung des Risikofaktorprofils, vor allem der etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie, Nikotinabusus und Adipositas, spiegeln sich diese beiden Gruppen wider. Die Patientengruppe besteht zu 73,8% aus Männern, während der Anteil männlicher Probanden in der Kontrollgruppe genau die Hälfte beträgt, was durch die etwa doppelt so hohe KHK-Prävalenz in der männlichen Bevölkerung erklärt ist (124). Entsprechend den genannten Risikofaktoren finden wir in unserer Studie einen deutlich höheren Anteil an Diabetikern, Patienten mit arteriellem Hypertonus und Dyslipoproteinämie in der KHK-Gruppe (Tab. 2). Die Werte des gemessenen systolischen und diastolischen Blutdrucks sind ähnlich verteilt, was potentiell auf eine gute medikamentöse Einstellung des Blutdrucks bei den Patienten mit KHK zurückzuführen ist. Diese Aussage wird durch die Angaben in Tab. 5 bestätigt,

hier ist ersichtlich, dass signifikant mehr Patienten bei Aufnahme in die Studie eine Betaadrenorezeptorblocker- und ACE-Hemmer-Medikation erhielten.

Während anamnestisch in der KHK-Gruppe ein deutlich höherer Anteil von Patienten mit Dyslipoproteinämie gefunden werden konnte, unterscheiden sich die auf eine Fettstoffwechselstörung hinweisenden Laborparameter nicht von denen der Kontrollgruppe. Entgegengesetzt zu den erwarteten Werten sind die Werte für das Gesamtcholesterin und das LDL-Cholesterin in der KHK-Gruppe sogar niedriger (Tab. 3). Der Grund dafür liegt am ehesten in einer konsequenten Behandlung mit lipidmodulierenden Medikamenten, allen voran den Statinen (62 Patienten mit KHK und zwei Kontrollpatienten erhielten Statine). Diese haben vor allem Einfluss auf die betreffenden Parameter Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin, weniger auf Triglyceride und das antiatherogene HDL-Cholesterin, was in einer Studie von 1994 an 4.444 Patienten nachgewiesen wurde (125).

Weiterhin findet sich in der Gruppe der Patienten mit KHK ein wesentlich höherer Anteil an Patienten mit Diabetes mellitus, was die allgemein bekannte Bedeutung des Diabetes als kardiovaskulären Risikofaktor bestätigt (126).

Der höhere Anteil an Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt, einer früheren Koronarintervention oder aortokoronarer Bypassoperation sowie einem vorangegangenen zerebrovaskulären Ereignis wie Schlaganfall oder TIA als weitere Manifestationsform der Atherosklerose erklärt sich von selbst. Auch der Unterschied des Anteils der Patienten mit PAVK, welche ausschließlich in der Patientengruppe zu finden waren, und der damit verbundene Unterschied im Knöchel-Arm-Index sind im Kontext der Atherosklerose erklärbar.

Es gibt viele Studien, die den Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz und der Prävalenz und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen untersucht haben. Bruce et al. zeigten 1999, dass bereits eine milde Niereninsuffizienz, definiert als Serum-Kreatinin-Wert von 136-265 $\mu\text{mol/l}$ bei Männern und 120-265 $\mu\text{mol/l}$ bei Frauen, mit einem gehäuften Auftreten einer ischämischen Herzerkrankung sowie einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert ist (127,128). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch wir deutlich höhere Werte von Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff als Marker der renalen Funktion bei Patienten mit KHK nachweisen. Die GFR war dagegen nicht signifikant erhöht ($p=0,095$).

Weitere Unterschiede fanden sich in der Höhe des BNP und des Hämoglobin-Wertes. Das BNP als diagnostischer und prognostischer Parameter zur Erfassung einer Herzinsuffizienz war in der KHK-Gruppe deutlich erhöht (Tab. 3). Im Jahr 2003 wurden in einer Studie von Goetze et al. Patienten mit koronarer Dreifäßerkrankung und Zustand nach ACB-OP, Patienten mit stabiler Angina pectoris, mit dilatativer Kardiomyopathie ohne KHK und Patienten ohne KHK oder Herzinsuffizienz miteinander verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serum-BNP-Werte nicht nur bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz, sondern auch bei Patienten mit KHK ohne begleitende Kardiomyopathie vorhanden sind (129), was im Einklang zu den von uns gemessenen Ergebnissen steht. Auch das Hämoglobin wurde in einigen Studien als Risikofaktor identifiziert. Levin et al.

zeigten 2002 einen Zusammenhang zwischen niedrigem Hämoglobin-Wert und kardiovaskulären Ereignissen bei niereninsuffizienten Patienten (130). In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2005 mit rund 40.000 Patienten wurde eine signifikante Korrelation von Hämoglobin und ACS-Ereignisraten nachgewiesen, hier wurden niereninsuffiziente Patienten ausgeschlossen (131). Nicht zuletzt konnte im Jahr 2011 dieser Zusammenhang in einer weiteren Studie mit etwa 35.000 Probanden auch für die stabile KHK und Patienten mit anamnestisch stattgehabtem Myokardinfarkt bestätigt werden (132).

Seit den siebziger Jahren sind zahlreiche Studien durchgeführt worden, welche die Bedeutung der Leukozyten und deren Subpopulationen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht haben. Ernst et al. zeigten 1987, dass die Menge der im Blut zirkulierenden Leukozyten mit einem erhöhten Risiko eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls assoziiert ist (133), Yarnell et al. zeigten die Bedeutung der Leukozyten als Risikofaktor für die Entwicklung einer ischämischen Herzerkrankung (134). In einer Studie mit 7.651 Patienten wurde 2001 festgestellt, dass Werte über 10.000 eine erheblich höhere 30-Tage- und 10-Monats-Mortalität prognostizieren (135). Ernst hob dabei neben der Rolle der Gesamtleukozyten vor allem die der neutrophilen Granulozyten hervor, was den inflammatorischen Charakter der KHK widerspiegelt. Auch nach einem Myokardinfarkt konnten vermehrt Leukozyten und vor allem Neutrophile im Blut nachgewiesen werden, deren Rückgang auch mit einem Rückgang der ST-Elevation im EKG assoziiert war (136). Hier zeigte sich außerdem eine Monozytose bei den entsprechenden Patienten. Passend zu diesen Ergebnissen finden sich auch in unserer Studie signifikant mehr Gesamtleukozyten sowie Neutrophile und Monozyten im Differentialblutbild der Patienten mit KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 4). Diese werden bei der Bildung eines Thrombus vermehrt zum Läsionsort rekrutiert. Auffällig ist weiterhin eine Erhöhung der eosinophilen Granulozyten im Patientenkollektiv. In einer Studie von 2009 wurde gezeigt, dass die Anzahl der im Thrombus histologisch nachweisbaren Eosinophilen mit der Thrombusgröße assoziiert ist (137). Untersuchungen zur Eosinophilen-Vermehrung im peripheren Blut gibt es allerdings kaum. Patienten mit einem hypereosinophilen Syndrom (HES) versterben signifikant häufiger an kardiovaskulären Komplikationen als die Normalbevölkerung (138).

Die Rolle der Lymphozyten, vor allem der T-Helferzellen als Zellen der spezifischen Immunabwehr, bei der Entstehung der Atherosklerose ist gut untersucht. Sie werden vermehrt zum Ort der atherosklerotischen Läsion rekrutiert und produzieren dort Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Dies hat besondere Bedeutung bei der Destabilisierung von Plaques im Rahmen eines ACS. So wurden erhöhte Aktivitätslevel von T-Lymphozyten, gemessen an der VLA-1 (very late activation antigen 1) und HLA-DR (human leukocyte antigen, Isotyp DR)-Produktion, bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris sowohl innerhalb von Plaques, aber auch im peripheren Blut nachgewiesen (139,140). Das Aktivitätslevel wurde in unserer Studie nicht untersucht, aber auch eine Erhöhung der Lymphozytenzahl fand sich nicht (Tab. 4). Dies war auch nicht zu erwarten, da unsere Studie vorrangig Patienten mit stabiler KHK umfasste und somit keine T-Zell-Aktivierung im Sinne eines ACS vorlag.

5.5 Fazit

Wir konnten mit der vorliegenden Studie bestätigen, dass bei Patienten mit KHK im Vergleich zu gesunden Probanden eine endotheliale Dysfunktion signifikant häufiger nachweisbar ist. Die Patienten mit nachgewiesener endothelialer Dysfunktion haben ein tendenziell schlechteres Outcome, wobei jedoch keine Signifikanz erreicht werden konnte. Der Zusammenhang mit den pro-inflammatorischen Monozytensubpopulationen konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Auch gab es keine Assoziation von Monozytensubpopulationen und dem Vorliegen einer gesicherten KHK. Ein wichtiger Aspekt bei der Auswertung dieser Ergebnisse ist die von uns gemessene Verteilung der Subpopulationen, die sich nicht mit dem Großteil der bereits vorliegenden Daten zu diesem Thema deckt. Eine Assoziation der CD16-positiven Monozyten zur endothelialen Dysfunktion konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

Am Beginn der Entstehung einer Atherosklerose steht die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, welche gekennzeichnet ist durch eine verringerte Bioverfügbarkeit des Mediators Stickstoffmonoxid. Am gesunden Endothel wird durch Einwirkung von laminaren Scherkräften eine cGMP-gekoppelte Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung der eNOS führt und so über die Ausschüttung von NO eine Vasodilatation bewirkt. Bei der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion verliert das Endothel seine gefäßrelaxierenden, antithrombotischen und antiproliferativen Eigenschaften, so dass sich vermehrt Lipoproteine in die Gefäßwand einlagern können. Es folgt eine inflammatorische Reaktion, die durch die vermehrte Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten vermittelt wird und auf einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen beruht. In den letzten Jahren wurde dabei eine besondere Bedeutung der CD16-positiven Monozyten herausgestellt, die vor allem inflammatorische Eigenschaften besitzen. Eine Erhöhung dieser Monozytensubpopulation konnte bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit im Jahr 2004 erstmalig und erneut in einer aktuellen Studie gezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, eine Assoziation zwischen der durchflusszytometrisch gemessenen Anzahl der CD16+Monozyten und dem Grad der endothelialen Dysfunktion nachzuweisen, um zu zeigen, dass diese Zellpopulation an der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und damit an der Entstehung der Atherosklerose maßgeblich beteiligt ist. Im vorliegenden Patientenkollektiv konnte diese jedoch nicht gezeigt werden. Auch eine Erhöhung der CD16-positiven Monozyten war im Vergleich zum koronargesunden Kontrollkollektiv nicht nachweisbar. Zudem zeigte sich ein Anteil von etwa 60% an CD16+Monozyten, was im Widerspruch steht zum überwiegenden Teil der bisher zu diesem Thema veröffentlichten Publikationen.

Eine endotheliale Dysfunktion, angegeben als PAT-Index, war wie erwartet deutlich häufiger bei Patienten mit KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Korrelationen zu den klassischen Risikofaktoren und prognostisch relevanten Laborparametern fanden sich nur vereinzelt. Die Waist-Hip-Ratio war mit einer signifikant schlechteren Endothelfunktion assoziiert, ebenso wie das Vorliegen einer Dyslipoproteinämie. Weiterhin konnte ein Zusammenhang mit dem Nierenretentionsparameter Kreatinin festgestellt werden. Dies entspricht den Ergebnissen aus aktuellen Studien, welche das Vorliegen einer Niereninsuffizienz als unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK identifiziert haben. Als Ausdruck der systemischen endothelialen Dysfunktion wäre jedoch zusätzlich eine Erhöhung der ACR im Spontanurin zu erwarten gewesen. Diesbezüglich waren die Ergebnisse jedoch ebenfalls negativ.

Der Einfluss einer verschlechterten Endothelfunktion auf die Mortalität konnte zwar tendenziell gezeigt werden, jedoch wird keine statistische Signifikanz erreicht.

Die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion konnte also anhand des vorliegenden Patientenkollektivs gezeigt werden. Der erwartete Zusammenhang mit dem Vorliegen einer CD16+Monozytose bleibt jedoch unbestätigt.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Statistisches Bundesamt. Fachserie 12, Reihe 4, Wiesbaden, 23.09.2011. S. 10. online verfügbar unter www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400107004.pdf?__blob=publicationFile (zugegriffen am 25.01.2012)
- 2 Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. 354 vom 23.09.2011. online verfügbar unter www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD_354_232.html (zugegriffen am 25.01.2012)
- 3 Herzbericht: Mehr Katheterbehandlungen – weniger Koronartote. Deutsches Ärzteblatt, Düsseldorf, 7.10.2011. Online verfügbar unter www.aerzteblatt.de/nachrichten/47621 (zugegriffen am 25.01.2011)
- 4 Herold G: Innere Medizin. Köln, 2008, S. 215
- 5 D'Agostino RB, Russell MW, Huse DM, Ellison RC, Silbershatz H, Wilson PW, Hartz SC (2000) Primary and subsequent coronary risk appraisal: New results from The Framingham Study. *Am Heart J* 139: 272-281
- 6 D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB (2008) General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care : The Framingham Heart Study. *Circulation* 117: 743-753
- 7 Patel VB, Robbins MA, Topol EJ (2001) C-reactive protein: A 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 68 (6): 521-534
- 8 Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P (2004) New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation* 109: III15-III19
- 9 Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL (2001) Association Between Myeloperoxidase Levels and Risk of Coronary Artery Disease. *JAMA* 286: 2136-2142
- 10 Erdmann E: Klinische Kardiologie. 6. Aufl. Springer, Berlin, 2008. Available at: <http://www.amazon.de/Klinische-Kardiologie-Krankheiten-Herzens-Kreislaufs/dp/3540237429> (Zugegriffen am 19.01.2012).
- 11 Schmidt R, Lang F: Physiologie des Menschen. 30. Aufl. Springer-Verlag, Tübingen, 2007, S. 614ff
- 12 Loscalzo J, Möckel M: Harrisons Kardiologie. ABW Wissenschaftsverlag Berlin, 2010, S. 373-378
- 13 Libby P, Theroux P (2005) Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* 111: 3481-3488
- 14 Ross R (1999) Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
- 15 Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917): 868-874.
- 16 Loscalzo J, Möckel M: Harrisons Kardiologie. ABW Wissenschaftsverlag Berlin, 2010, S. 426-485

- 17 Norbert Donner-Banzhoff N, Held K, Laufs U, Trappe HJ, Werdan K, Zerkowski HR, Nationale VersorgungsLeitlinie. Chronische KHK. Kurzfassung. Version 1.13. Juli 2012. (Gültigkeit bis 31. Dezember 2012) Online verfügbar unter <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/khk/pdf/nvl-khk-kurz-1.13.pdf> (zugegriffen am 12.12.2012)
- 18 Hamm, CW et al (2009) Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS). Kommentierte Kurzfassung. *Der Kardiologe* 3: 81-100
- 19 Silber, S et al (2010) Kommentare zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). *Der Kardiologe* 4: 84-90
- 20 Lüllmann-Rauch R: Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschriften. Thieme-Verlag, Kiel, 2003, S. 208-211
- 21 Gekle M, Wischmayer E: Taschenlehrbuch Physiologie. Thieme-Verlag, Zwenkau, 2010, S. 223-229
- 22 Furchgott RF (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research* 53: 557-573
- 23 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007) Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 115: 1285-1295
- 24 Gornik HL, Creager MA (2004) Arginine and Endothelial and Vascular Health. *J. Nutr.* 134: 2880S-2887S
- 25 Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation* 101: 1899-1906
- 26 Lerman A, Zeiher AM (2005) Endothelial. Function: Cardiac Events. *Circulation* 111: 363-368
- 27 Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA (2002) Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. *Circulation* 106: 653-658
- 28 Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, Karas RH (2001) Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 38(7): 1843-1849
- 29 Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-175
- 30 Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research* 87: 840-844
- 31 Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A (2005) Activity and Expression of the Soluble Guanylyl Cyclase and the Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling for the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1551-1557

- 32 Stocker R, Keaney JF Jr (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84(4): 1381-1478.
- 33 Hoffman GS, Weyand CM. *Inflammatory Diseases of Blood Vessels.* New York, 2002, S. 87-103
- 34 Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143
- 35 Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- 36 Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H (1991) Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83: 391-401
- 37 Sinoway LI, Hendrickson C, Davidson WR Jr, Prophet S, Zelis R (1989) Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects. *Circulation Research* 64: 32-42
- 38 Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*: 257–265
- 39 Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *The Lancet* 340: 1111-1115
- 40 Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, Satomura K, Ohsuzu F, Kurita A (1998) Endothelium-Dependent Flow-Mediated Vasodilation in Coronary and Brachial Arteries in Suspected Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology* 82: 1535-1539
- 41 Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F (1997) Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 129: 111-118
- 42 Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM (2007) Brachial Flow-Mediated Dilation Predicts Incident Cardiovascular Events in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation* 115: 2390-2397
- 43 Sawada T, Emoto T, Motoji Y, Hashimoto M, Kageyama H, Terashita D, Mizoguchi T, Mizoguchi T, Iwasaki M, Taira K, Okamoto H, Matsuo Y, Kim SK, Takarada A, Yokoyama M (2013) Possible association between non-invasive parameter of flow-mediated dilatation in brachial artery and whole coronary plaque vulnerability in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 166 (3): 613-620
- 44 Frick M, Neunteufl T, Schwarzacher SP, Wascher TC, Weidinger F (2002) Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* 9(10), 439-444

- 45 Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP (2010) Assessing Endothelial Vasodilator Function with the Endo-PAT 2000. *Journal of Visualized Experiments* 44: 2167 (published online 2010 October 15)
- 46 Hamburg NM, Benjamin EJ (2009) Assessment of Endothelial Function Using Digital Pulse Amplitude Tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 19: 6-11
- 47 Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE (2003) Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 146: 168-174
- 48 Celermajer DS (2008) Reliable Endothelial Function Testing: At Our Fingertips? *Circulation* 117: 2428-2430
- 49 Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A (2004) Noninvasive Identification of Patients With Early Coronary Atherosclerosis by Assessment of Digital Reactive Hyperemia. *Journal of the American College of Cardiology* 44: 2137-2141
- 50 Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ (2008) Cross-Sectional Relations of Digital Vascular Function to Cardiovascular Risk Factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 117: 2467-2474
- 51 Haller MJ, Stein J, Shuster J, Theriaque D, Silverstein J, Schatz DA, Earing MG, Lerman A, Mahmud FH (2007) Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes* 8: 193-198.
- 52 Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kaikita K, Kojima S, Nagayoshi Y, Yamamuro M, Izumiya Y, Iwashita S, Matsui K, Jinnouchi H, Kimura K, Umemura S, Ogawa H (2010) Digital Assessment of Endothelial Function and Ischemic Heart Disease in Women. *Journal of the American College of Cardiology* 55: 1688-1696
- 53 Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR: Taschenatlas der Immunologie. 2. Aufl. Thieme-Verlag, Wemding, 2007, S. 2; 50ff
- 54 Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, Zembala M (2004) Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Experimental Hematology* 32: 748-755
- 55 Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534
- 56 Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373-377
- 57 Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002) The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542
- 58 Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82: 3170-3176

- 59 Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S (2000) CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 121: 566-570
- 60 Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H (2002) CD14+,CD16+ Blood Monocytes and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 46(10): 2578-2586
- 61 Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 81: 584-592
- 62 Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW (1998) Selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112: 501-506
- 63 Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E (2010) Inflammation in Atherosclerosis: Transition from theory to practice. *Circulation* 121(2): 213-220
- 64 Ziegler-Heitbrock HW (1996) Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. *Immunology today* 17: 424-428
- 65 Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ (2004) CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF alpha level. *Thromb Haemost* 92: 419-424
- 66 Boldt F, Hansel J, Huonker M, Löllgen H, Nührenböcker C, Schmitt H, Urhausen A (2007) S 1-Leitlinie. Vorsorgeuntersuchung im Sport. S. 26. online verfügbar unter http://www.dgsp.de/_downloads/allgemein/S1_Leitlinie.pdf (zugegriffen am 11.01.2012)
- 67 Thompson CJ, Ryu JE, Craven TE, Kahl FR, Crouse JR 3rd (1991) Central adipose distribution is related to coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 11: 327-333
- 68 Keil E, Fiedler H: *Klinische Chemie systematisch*. 1. Aufl. Uni-Med, Bremen, 2000
- 69 Bruhn HD, Fölsch UR: *Lehrbuch der Labormedizin. Grundlagen, Diagnostik, Klinik, Pathobiochemie*. Schattauer, Stuttgart, 1999, S. 109-113
- 70 Hamm CW, Albrecht A, Bonzel T, Kelm M, Lange H, Schächinger V, Terres W, Voelker W (2008) LEITLINIE Diagnostische Herzkatheteruntersuchung. *Clin Res Cardiol* 97(8): 475-512
- 71 Lapp H, Krakau I: *Das Herzkatheterbuch. Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*. 3. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart, 2010
- 72 Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR: *Taschenatlas der Immunologie*. 2. Aufl. Stuttgart, 2007, S. 42
- 73 Ulrich C, Heine GH, Garcia P, Reichart B, Georg T, Krause M, Köhler H, Girndt M (2006) Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21: 1596-1602
- 74 Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH (2011) CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European Heart Journal* 32: 84-92

- 75 Kasili PM, Vo-Dinh T (2006) Hyperspectral Imaging System Using Acousto-Optic Tunable Filter for Flow Cytometry Applications. *Cytometry Part A* 69A: 835-841
- 76 Assessing Endothelial Function: Overview & Scientific Validation of EndoPAT (2009) Itamar medical. online verfügbar unter <http://www.itamarmedical.com/images/EndoPOVInternet%20October%202009.pdf> (zugegriffen am 11.01.2012)
- 77 Heffernan KS, Karas RH, Patvardhan EA, Jafri H, Kuvin JT (2010) Peripheral Arterial Tonometry for Risk Stratification in Men With Coronary Artery Disease. *Clin Cardiol* 33(2): 94-98
- 78 Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K, Kugiyama K (2009) Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 53(4): 323-330
- 79 Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, Pumper GM, Lerman LO, Lerman A (2010) Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *European Heart Journal* 31: 1142-1148
- 80 Chang A, Kramer H (2011) Should eGFR and Albuminuria Be Added to the Framingham Risk Score? *Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Risk Prediction. Nephron Clin Pract* 119: c171-c178
- 81 Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A (1989) Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* 32(4): 219-226
- 82 Mohan S, Reddick RL, Musi N, Horn DA, Yan B, Prihoda TJ, Natarajan M, Abboud-Werner SL (2008) Diabetic eNOS knockout mice develop distinct macro- and microvascular complications. *Lab Invest* 88(5): 515-528
- 83 Berton G, Cordiano R, Palmieri R, Cucchini F, De Toni R, Palatini P (2001) Microalbuminuria during acute myocardial infarction. A strong predictor for 1-year mortality. *European Heart Journal* 22(16): 1466-1475
- 84 Sung JK, Kim JY, Youn YJ, Lee JW, Ahn SG, Yoo BS, Lee SH, Yoon J, Choe KH, Yoon JH, Park JK, Koh SB (2010) Urine Albumin Creatinine Ratio is Associated with Carotid Atherosclerosis in a Community Based Cohort: Atherosclerosis Risk of Rural Area in Korean General Population Study. *J Cardiovasc Ultrasound* 18(4): 134-138
- 85 Ott C, Schneider MP, Delles C, Schlaich MP, Schmieder RE (2011) Reduction in Basal Nitric Oxide Activity Causes Albuminuria. *Diabetes* 60: 572-576
- 86 Kathiresan S, Gona P, Larson MG, Vita JA, Mitchell GF, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Wang TJ, Benjamin EJ, Vasani RS (2006) Pathways to Brachial Artery Endothelial Function Cross-Sectional Relations of Multiple Biomarkers From Distinct Biological. *Circulation* 113: 938-945
- 87 Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Yamamoto K, Wakamatsu Y, Tanaka S, Kimura G (2011) Impact of lipid profile and high blood pressure on endothelial damage. *J Clin Lipidol* 5(6): 460-466

- 88 Rasmussen JG, Eschen RB, Aardestrup IV, Dethlefsen C, Griffin BA, Schmidt EB (2009) Flow-mediated vasodilatation: variation and interrelationships with plasma lipids and lipoproteins. *Scand J Clin Lab Invest* 69(1): 156-160
- 89 Van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, de Leeuw PW (1999) Effects of brain natriuretic peptide on forearm vasculature: comparison with atrial natriuretic peptide. *Cardiovasc Res.* 44(3): 595-600
- 90 Van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, De Mey JG, Smits PA, de Leeuw PW (2002) Nitric oxide and potassium channels are involved in brain natriuretic peptide induced vasodilatation in man. *J Hypertens* 20(3): 493-499
- 91 Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY (2004) Endothelial Dysfunction and Damage in Congestive Heart Failure : Relation of Flow-Mediated Dilatation to Circulating Endothelial Cells, Plasma Indexes of Endothelial Damage, and Brain Natriuretic Peptide. *Circulation* 110: 1794-1798
- 92 Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM (2003) Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score. *Circulation* 108(2): 161-165
- 93 Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C (2006) Endothelial function and inflammation in coronary artery Disease. *Heart* 92: 441-444
- 94 Clapp BR, Hirschfield GM, Storry C, Gallimore JR, Stidwill RP, Singer M, Deanfield JE, MacAllister RJ, Pepys MB, Vallance P, Hingorani AD (2005) Inflammation and Endothelial Function: Direct Vascular Effects of Human C-Reactive Protein on Nitric Oxide Bioavailability. *Circulation* 111: 1530-1536
- 95 Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM (2000) Elevated C-Reactive Protein Levels and Impaired Endothelial Vasoreactivity in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 102: 1000-1006
- 96 Vita JA, Keaney JF Jr, Larson MG, Keyes MJ, Massaro JM, Lipinska I, Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Wilson PW, Vasan RS, Mitchell GF, Benjamin EJ (2004) Brachial Artery Vasodilator Function and Systemic Inflammation in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 110: 3604-3609
- 97 Roh EJ, Lim JW, Ko KO, Cheon EJ (2007) A Useful Predictor of Early Atherosclerosis in Obese Children: Serum High-sensitivity C-reactive Protein. *J Korean Med Sci* 22: 192-197
- 98 Kharbanda RK, Walton B, Allen M, Klein N, Hingorani AD, MacAllister RJ, Vallance P (2002) Prevention of Inflammation-Induced Endothelial Dysfunction: A Novel Vasculo-Protective Action of Aspirin. *Circulation* 105: 2600-2604
- 99 Woodman RJ, Watts GF, Puddey IB, Burke V, Mori TA, Hodgson JM, Beilin LJ (2002) Leukocyte count and vascular function in Type 2 diabetic subjects with treated hypertension. *Atherosclerosis* 163(1): 175-181
- 100 Elkind MS, Sciacca RR, Boden-Albala B, Tondella ML, Feikin DR, Fields BS, Sacco RL, Di Tullio MR, Homma S (2005) Leukocyte count is associated with reduced endothelial reactivity. *Atherosclerosis* 181(2): 329-338
- 101 van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M (2003) Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res.* 44(3): 576-583

- 102 Walker AE, Seibert SM, Donato AJ, Pierce GL, Seals DR (2010) Vascular endothelial function is related to white blood cell count and myeloperoxidase among healthy middle-aged and older adults. *Hypertension* 55(2): 363-369
- 103 Anderson T (1999) BANFF: an update. *Can J Cardiol* 15: 29B-30B
- 104 Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Thuncke F, Fröhlich M, Tschentscher P, Schwedhelm E, Böger R, Meinertz T, Munzel T (2007) AT1-receptor blockade with irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 194(2): 439-445
- 105 Fujimura N, Noma K, Hata T, Soga J, Hidaka T, Idei N, Fujii Y, Mikami S, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kihara Y, Chayama K, Kato H, Liao JK, Higashi Y; ROCK Study Group (2001) Mineralocorticoid receptor blocker eplerenone improves endothelial function and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 91(2): 289-297
- 106 Lovisi JC, Ezequiel DA, Costa MB, Bicalho TC, Barros FC, Souza Gdo C, Paula RB (2011) Espironolactone improves flow-mediated vasodilatation in subjects with the metabolic syndrome. *J Bras Nefrol* 33(4): 463-466
- 107 Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirata Y (2009) Endothelial Dysfunction is Related to Aldosterone Excess and Raised Blood Pressure. *Endocrine Journal* 56(4): 553-559
- 108 Guven GS, Atalar E, Yavuz B, Beyazit Y, Kekilli M, Kilicarslan A, Sahiner L, Oz G, Ozer N, Aksoyek S, Haznedaroglu IC, Sozen T (2006) Simvastatin treatment improves endothelial function and increases fibrinolysis in patients with hypercholesterolemia. *J Natl Med Assoc* 98(4): 627-630
- 109 Aengevaeren WR (1999) Beyond lipids - the role of the endothelium in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 147(1): 11-16
- 110 Glynn RJ, MacFadyen JG, Ridker PM (2009) Tracking of High-Sensitivity C-Reactive Protein after an Initially Elevated Concentration: The JUPITER Study. *Clinical Chemistry* 55(2): 305-312
- 111 Hristov M, Weber C (2011) Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis* 106(5): 757-762
- 112 Scherberich JE, Nockher WA (1999) CD14⁺⁺Monocytes, CD14⁺/CD16⁺ Subset and Soluble CD14 as Biological Markers of Inflammatory Systemic Diseases and Monitoring Immunosuppressive Therapy. *Clin Chem Lab Med* 37(3): 209-213
- 113 Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stöhr J, Kindermann W, Schmitz G (1996) Peripheral Blood Mononuclear Phagocyte Subpopulations as Cellular Markers in Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16: 1437-1444
- 114 Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D (2003) Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16⁺Monocytes. *J. Exp. Med.* 197(12): 1701-1707
- 115 Charo IF, Taubman MB (2004) Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. *Circulation Research* 95: 858-866

- 116 Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F (2004) Antagonism of RANTES Receptors Reduces Atherosclerotic Plaque Formation in Mice. *Circulation Research* 94: 253-261
- 117 Umehara H, Imai T (2001) Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury. *Drug News Perspect* 14(8): 460-464
- 118 Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16): e74-e80
- 119 Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Köhler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH (2010) Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European Heart Journal* 31: 369-376
- 120 Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH (2012) CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 60(16): 1512-1520
- 121 Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, Nilsson J, Björkbacka H (2012) Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet.* 5(1): 122-131
- 122 Nasir K, Guallar E, Navas-Acien A, Criqui MH, Lima JA (2005) Relationship of Monocyte count and Peripheral Arterial Disease: Results From the National Health and Nutrition Examination Survey 1999. 2000. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1966-1971
- 123 Urra X, Villamor N, Amaro S, Gómez-Choco M, Obach V, Oleaga L, Planas AM, Chamorro A (2009) Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 29: 994–1002
- 124 Herold G: *Innere Medizin.* Köln, 2008, S. 215
- 125 Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyörälä K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (2004) Randomised Trial of Cholesterol Lowering in 4444 Patients with Coronary Heart Disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl.* 5(3): 81-87
- 126 Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339(4): 229-234
- 127 Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D (1999) Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney International* 56: 2214-2219
- 128 Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW (2003) Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108: 2154-2169

- 129 Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrup J, Nielsen LB (2003) Increased cardiac BNP expression associated with myocardial Ischemia. *FASEB J.* 17(9): 1105-1107
- 130 Levin A (2002) The relationship between haemoglobin level and survival: direct or indirect effects? *Nephrol Dial Transplant* 17 (5): 8-13
- 131 Sabatine MS, Morrow DA, Giugliano RP, Burton PB, Murphy SA, McCabe CH, Gibson CM, Braunwald E (2005) Association of Hemoglobin Levels With Clinical Outcomes in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 111: 2042-2049
- 132 Shah AD, Nicholas O, Timmis AD, Feder G, Abrams KR, Chen R, Hingorani AD, Hemingway H (2011) Threshold Haemoglobin Levels and the Prognosis of Stable Coronary Disease: Two New Cohorts and a Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 8(5): e1000439
- 133 Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA (1987) Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 257(17): 2318-2324
- 134 Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC (1991) Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 83: 836-838
- 135 Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Bentley JH, Braunwald E (2001) Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. OPUS-TIMI 16 Investigators. *The American Journal of Cardiology* 87(5): 636-639
- 136 Mariani M, Fetiveau R, Rossetti E, Poli A, Poletti F, Vandoni P, D'Urbano M, Cafiero F, Mariani G, Klersy C, De Servi S (2006) Significance of total and differential leucocyte count in patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *European Heart Journal* 27: 2511-2515
- 137 Sakai T, Inoue S, Matsuyama TA, Takei M, Ota H, Katagiri T, Koboyashi Y (2009) Eosinophils May Be Involved in Thrombus Growth in Acute Coronary Syndrome. *Histologic Examination of Aspiration Samples.* *Int Heart J* 50: 267-277
- 138 Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK 3rd (2007) Cardiovascular Manifestations of Hypereosinophilic Syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 27(3): 457-475
- 139 Hansson GK, Holm J, Jonasson L (1989) Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 135(1): 169-175
- 140 Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggese L, Rostagno C, Gensini GF, Abbate R (1997) Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation.* 95(7): 1806-1812

8. Thesen

1. Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterien.

2. Die endotheliale Dysfunktion stellt die früheste Manifestationsform der Atherosklerose dar und besitzt prognostische Eigenschaften hinsichtlich des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen. In ihrem Mittelpunkt steht die verminderte Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO).

3. NO besitzt vasodilatorische, antiinflammatorische und antithrombotische Eigenschaften und ist damit an der Regulierung des Gefäßtonus maßgeblich beteiligt.

4. Die Freisetzung von NO kann unter anderem durch Scherkräfte induziert werden, so dass es zu einer blutflussinduzierten Vasodilatation kommt. Diese lässt sich nichtinvasiv mit der RH-PAT-Methode messen.

5. Die Subpopulation der CD16-positiven Monozyten induziert durch proinflammatorische Zytokine eine Schädigung der Endothelzellen und ist bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung erhöht und ein unabhängiger Risikofaktor für zukünftige schwerwiegende Ereignisse.

6. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Störung der Endothelfunktion, gemessen durch eine verminderte Gefäßantwort auf den Reiz einer reaktiven Hyperämie, mit einer erhöhten Anzahl von CD16-positiven Monozyten im Blut einhergeht. Diese wurde durch Oberflächenfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender FACS-Analyse ermittelt.

7. Die Studienpopulation besteht aus einer Subanalyse der PHAMOS-Studie des Universitätsklinikums Halle (Saale) und umfasste 80 Patienten mit KHK und 40 koronargesunde Personen.

8. Der PAT-Index war in der vorliegenden Untersuchung signifikant niedriger bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Patienten mit KHK haben damit signifikant häufiger eine gestörte Endothelfunktion (Median 1,61 bei Patienten mit KHK und 1,81 bei Kontrollpatienten; $p < 0,001$).

9. Die gemessene prozentuale Verteilung der Monozytensubpopulationen entspricht nicht der Verteilung, welche im überwiegenden Teil der gängigen Fachliteratur angegeben wird (CD16-negative Monozyten 39,3% ($\pm 19,6$), CD14+CD16+-Monozyten 35,2% ($\pm 16,5$), CD14-CD16++Monozyten 25,6% ($\pm 11,3$), statt etwa 80% CD16-negative und 10-20% CD16-positive Monozyten).

10. Weder für Fall- noch für Kontrollgruppe konnte eine signifikante Korrelation von PAT-Index und Monozyten-Subpopulationen nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Absolutzahlen zeichnet sich jedoch eine nichtsignifikante Tendenz ab.

11. In der Kaplan-Meier-Analyse kann für Patienten mit gestörter Endothelfunktion kein Überlebensnachteil gezeigt werden, auch wenn ein Trend hinsichtlich mehr Ereignissen in dieser Patientengruppe bestand ($p=0,281$).

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Geburtsdaten: 23. März 1986 in Elsterwerda
Wohnort: 04932 Merzdorf, Weinbergstraße 7
E-Mail-Adresse: peggy.guentner@yahoo.de
Mobiltelefon: 0174 328 46 93
Staatsangehörigkeit: deutsch

■ Schulbildung

1992 – 1998 Grundschole Gröden
1998 – 2005 Elsterschloss-Gymnasium Elsterwerda

■ Studium

2005 – 2011 Martin Luther Universität Halle - Wittenberg, Fachrichtung
Medizin
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 12.09.2007
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 26.10.2011
Okt. 2011 bis März 2012 Promotionsstudentin

■ Praktika

Famulaturen

- Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Niederlausitz, Lauchhammer
- Innere Medizin, Elbe-Elster-Klinikum, Elsterwerda
- Klinik für Chirurgie, Papageorgiou Hospital Thessaloniki, Griechenland
- Facharztpraxis für Pädiatrie, Dr. J. Frey, Gröditz

Praktisches Jahr

- Klinik für Innere Medizin, Städtisches Klinikum Dessau
- Klinik für Chirurgie, Städtisches Klinikum Dessau
- Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Kröllwitz, Halle (Saale)

■ Arbeitsstellen

Seit Juni 2012 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin des
Elblandklinikums Riesa

9.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

9.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass es keine früheren Promotionsversuche gegeben hat. Die vorliegende Arbeit ist der erste Promotionsversuch, der von mir unternommen wird.

Ort, Datum

Unterschrift

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen meinen Dank aussprechen, die an der Erstellung dieser Dissertation maßgeblich beteiligt sind.

Allen voran gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. habil. Axel Schlitt, der mich während der Durchführung meiner Untersuchungen und der Anfertigung der Arbeit intensiv betreut hat und mit vielen wertvollen fachlichen Ratschlägen sowie viel Geduld einen großen Anteil an der Fertigstellung der Arbeit hat.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Karl Werdan, welcher mir die Möglichkeit zur Dissertation in seiner Klinik gab.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Manuela Schlitt für die vielen Ratschläge in Sachen Organisation und Datenverarbeitung sowie unserer MTA Frau Doris Schulz, die mir während der Laborarbeit eine nicht zu ersetzende Hilfe war.

Meinen Kommilitonen Florian Höpfner, Marrit Jakob und Diana Umlauf für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Karin und Rudolf Güntner und meinem Lebensgefährten Marco Thielemann für die über den gesamten Zeitraum meines Studiums andauernde positive Motivation und Unterstützung.