

**Aus der  
Medizinischen Klinik IV  
Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Fliser**

---

**Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes  
als Marker subklinischer Atherosklerose**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes  
2009**

**vorgelegt von  
Lutz Tilmann Blömer, geboren am 20.09.1979 in Bremen**

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis .....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	4
1 Zusammenfassung .....	7
1.1 Zusammenfassung .....	7
1.2 Summary .....	8
2 Einleitung .....	10
2.1 Atherogenese .....	10
2.2 Intima Media Dicke und Atherosklerose .....	14
2.3 Periphere Lymphozyten als zelluläre Marker subklinischer Atherosklerose .....	15
3 Material und Methoden .....	17
3.1 Material .....	17
3.2 Studienteilnehmer .....	19
3.3 Studienablauf .....	20
3.4 Messung der Intima Media Dicke mittels Sonographie .....	20
3.5 Durchflusszytometrie .....	23
3.6 Standardisierte Vollblut Oberflächenfärbung .....	24
3.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten .....	26
3.8 Bestimmung weiterer Laborparameter .....	29
3.9 Datenverarbeitung und statistische Auswertung .....	30
4 Ergebnisse .....	31
4.1 Charakteristika der Studienteilnehmer .....	31
4.2 Assoziation der Intima Media Dicke mit kardiovaskulären Risikofaktoren .....	32
4.3 Assoziation der Intima Media Dicke mit Lymphozytenpopulationen .....	36
4.4 Assoziation der B-Lymphozyten und CD4+CD28- T-Lymphozyten mit atherosklerotischen Risikofaktoren .....	39
4.5 Assoziation der Intima Media Dicke mit B-Lymphozyten und CD4+CD28- T- Lymphozyten unter Berücksichtigung atherosklerotischer Risikofaktoren .....	41
5 Diskussion .....	44
5.1 Intima Media Dicke und atherosklerotische Risikofaktoren .....	44
5.2 Intima Media Dicke und Lymphozytensubpopulationen .....	46
5.2.1 Intima Media Dicke und Natürliche Killerzellen .....	47

5.2.2 Intima Media Dicke und B-Lymphozyten .....	48
5.2.3 Intima Media Dicke und T-Lymphozytensubpopulationen .....	49
5.2.4 Intima Media Dicke und CD4+ T-Lymphozyten .....	50
5.2.5 Intima Media Dicke und CD4+CD28- T-Lymphozyten .....	52
5.3 Einschränkungen .....	54
5.4 Ausblick .....	56
6 Literaturverzeichnis .....	58
7 Danksagungen .....	67
8 Anhang .....	68
8.1 Tabellenverzeichnis .....	68
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	69
8.3 Fragebogen .....	70
8.4 Lebenslauf .....	74

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung
ACC	Arteria Carotis Communis
ACEI	Angiotensin Converting Enzym Inhibitoren
ACI	Arteria Carotis Interna
ACS	Akutes Coronar Syndrom
AK	Antikörper
AP	Angina pectoris
APC	Allophycocyanin
BD	Becton Dickenson, Heidelberg
BIF	Bifurcatio (der Arteria Carotis)
BMI	Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation, spezifische Oberflächenantigene
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
et al.	et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
HDL	High Density Lipoprotein
hs-CRP	hochsensitives CRP
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IMT	Intima Media Thickness, Intima Media Dicke
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid

m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MSF	Macrophage Stimulating Factor
mW/cm <sup>2</sup>	Milliwatt pro Quadratcentimeter, Maß der Schallintensität
NaN <sub>3</sub>	Natriumnitrit
NK	Natürliche Killerzellen
n s	nicht signifikant
p	Signifikanzniveau (2-seitig)
pAVK	periphere arterielle Verschluss Krankheit
PAA	PAA, Paschingen
PBS	Dulbecco`s Phosphat Puffer
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>
ph	Maß für die Stärke einer sauren/basischen Lösung
resp.	respektive
PRIND	Prolongiertes Reversibles Ischämisches Defizit
PTCA	perkutane transluminale Coronare Angioplastie
r	Korrelationskoeffizient, Spearman-Rho-Rangkorrelation
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAE	subkortikale atherosklerotische Enzephalopathie
SERVA	SERVA, Heidelberg
SSC	Sideward Scatter
Tab.	Tabelle
TGFβ	Transforming Growth Factor β

TIA	Transitorische Ischämische Attacke
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
VCAM	Vacuuar Cell Adhesions Molecule
vs	versus

# 1 Zusammenfassung

---

## 1.1 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Zumeist sind diese Erkrankungen auf atherosklerotische Gefäßwandveränderungen zurückzuführen, denen eine chronische Entzündung der inneren Arterienwand zugrunde liegt. Neben den klassischen Risikofaktoren Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue Risikomarker identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko atherosklerotischer Gefäßveränderungen assoziiert sind. Dazu gehören auch sogenannte „Biomarker“, die Inflammationsvorgänge widerspiegeln. Bei diesen Markern handelt es sich vor allem um Komponenten des humoralen Immunsystems wie das C-reaktive Protein. Zelluläre Bestandteile des Immunsystems, deren Beteiligung an der Entstehung der Atherosklerose gesichert ist, sind in diesem Zusammenhang unzureichend untersucht worden. Monozyten und Lymphozyten spielen eine entscheidende Rolle in dem Entzündungsprozess und können bereits in frühen Stadien der Gefäßwandveränderung, den „fatty streaks“, nachgewiesen werden.

Lymphozyten des peripheren Blutes sind bisher als Risikomarker subklinischer atherosklerotischer Gefäßveränderungen unzureichend berücksichtigt worden. Die vorliegende Studie greift diese Fragestellung auf. Bei 411 Probanden ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen wurde das Ausmaß atherosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand mittels der sonographisch ermittelten Intima Media Dicke (IMT) der beiden Arteriae carotides communes erfasst. Lymphozytäre Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

Es ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der IMT und der Zellzahl der Gesamtlymphozyten, der Natürlichen Killerzellen oder der T-Lymphozyten nachweisen. Ebenso fanden sich keine signifikanten Assoziationen der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten oder CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Lymphozyten mit der IMT. Zwei Zellpopulationen, die B-Lymphozyten und die CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Lymphozyten, waren schwach positiv, aber signifikant mit der IMT korreliert. Wurden diese Assoziationen in multiplen Regressionsmodellen für klassische atherosklerotische Risikofaktoren korrigiert, bestand kein signifikanter Zusammenhang mehr.

Zusammenfassend sind in der vorliegenden Untersuchung die Zellzahl der B-Lymphozyten und der CD4+CD28- T-Lymphozyten in univariaten Analysen mit der IMT als Marker subklinischer Atherosklerose schwach positiv, aber signifikant korreliert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Untersuchungen bei Patienten mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Allerdings sind die Assoziationen zwischen der IMT und beiden Lymphozytenpopulationen nicht unabhängig von klassischen atherosklerotischen Risikofaktoren.

## 1.2 Summary

Cardiovascular diseases are the main cause of death in Germany. Often they are attributed to atherosclerotic changes of the vascular wall which result from a chronic inflammation of the inner artery wall. Besides classical risk factors - smoking, hypertension, diabetes mellitus and hyperlipidemia - many new risk markers of atherosclerosis were identified in the last years. These include so called "biomarkers" which reflect the inflammatory process in peripheral blood. The majority of these markers are components of the humoral immune system such as C-reactive protein ("CRP"). In this context cellular components of the immune system have been studied poorly even though their involvement in atherosclerosis is well established. Monocytes and lymphocytes both play a critical role in the inflammatory process and both can be detected already in early stages of wall lesions, the "fatty streaks".

Circulating lymphocytes have been explored insufficiently as risk markers of subclinical atherosclerosis. We therefore recruited 411 probands without prior cardiovascular diseases. The degree of subclinical atherosclerosis was recorded by sonographical measurement of the intima media thickness ("IMT") of the common carotid arteries. Lymphocyte subpopulations were measured by flow cytometry.

There were no significant correlations between IMT measurements and cell counts of total lymphocytes, natural killer cells or T-lymphocytes. Furthermore no associations were found for CD4+ T-lymphocytes, CD8+ T-lymphocytes or CD8+CD28- T-lymphocytes with IMT. Two lymphocyte subpopulations, B-lymphocytes and CD4+CD28- T-lymphocytes, correlated weakly positive but significant with IMT. These associations were no longer significant after adjustment for classical atherosclerotic risk factors in multiple regression models.

In summary, in univariate analysis, cell counts of B-lymphocytes or CD28-CD4<sup>+</sup> lymphocytes were weakly albeit significantly correlated with IMT as a marker of subclinical atherosclerosis. This study is consistent with data from patients with advanced atherosclerosis. However the associations between IMT and B-lymphocyte or CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-lymphocyte counts are not independent of the classical atherosclerotic risk factors.

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Atherogenese

Laut Statistischem Bundesamt stellten „Krankheiten des Kreislaufs“ im Jahr 2005, wie in den Jahren zuvor, die häufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2007). Ihnen erlag fast jeder Zweite (44,2 %). Etwa 66 % der Herz-Kreislauf bedingten Todesfälle waren auf eine der folgenden Krankheiten zurückzuführen: Ischämische Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Diese Krankheitsbilder sind meist durch atherosklerotische Wandveränderungen der arteriellen Gefäße bedingt. Auch in der gesamten westlichen Welt ist die Atherosklerose von großer Bedeutung (Murray et al., 1997).

Diese Bedeutung begründet das intensive Bemühen der Wissenschaft, Therapien für diese Erkrankung zu entwickeln. Hierzu ist ein Verständnis der zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge notwendig. Insbesondere epidemiologische Studien trugen zur Identifizierung von Faktoren bei, die das Risiko atherosklerotischer Gefäßveränderungen und kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen. Als solche sind inzwischen Alter, männliches Geschlecht, Rauchen, erhöhtes Cholesterin (Gesamt- und LDL-Cholesterin), erniedrigtes HDL-Cholesterin, Bluthochdruck, familiäre Belastung und Diabetes mellitus allgemein anerkannt und werden oft als „klassische Risikofaktoren“ bezeichnet. Die zentrale Rolle des LDL-Cholesterins wurde früh erkannt, so dass man eine Überladung mit Cholesterin für das Krankheitsgeschehen verantwortlich machte. In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts stellte sich jedoch heraus, dass dieses Konzept alleine die zugrunde liegenden Vorgänge unzureichend erklärt und dass an den Veränderungen der Gefäßwand ein entzündliches Geschehen entscheidend beteiligt ist. Diese Vorstellung ist inzwischen allgemein anerkannt (Ross, 1999). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse werden derzeit die Beteiligung des adaptiven und des angeborenen Immunsystems intensiv erforscht. Möglicherweise können durch gezielte Eingriffe in das Immunsystem effektive Strategien zur Prävention und Therapie atherosklerotisch bedingter Erkrankungen entwickelt werden.

Zahlreiche Untersuchungen haben das Konzept der Entstehung der Atherosklerose als ein entzündliches Geschehen der arteriellen Gefäße bestätigt (Hansson, 2005; Hansson et al., 2006). Das aktuelle Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge beruht größtenteils auf Tiermodellen, Zellkulturen, histologischen Untersuchungen, klinischen Erkenntnissen und

epidemiologischen Daten. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Hypothese der „Cholesterinüberladung“ mit der Vorstellung eines inflammatorischen Geschehens vereinbar ist (Steinberg, 2002). Vereinfacht dargestellt triggert das Cholesterin eine entzündliche Reaktion, die sich im Verlauf teilweise verselbständigt und zu den atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen führt.

Derzeit geht man davon aus, dass initial LDL-Cholesterin in der Gefäßwand zurückgehalten wird (Skålén et al., 2002; Leitinger, 2003). Da es in nativer Form kein inflammatorisches Potential besitzt, muss es chemisch verändert werden, um eine Immunantwort hervorzurufen. Vermutlich wird das LDL-Cholesterin dabei oxidiert. Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Fette, wahrscheinlich Phospholipide, aus der Gefäßwand (Leitinger, 2003). Auch Thrombozyten sind an diesem initialen Geschehen beteiligt (Massberg et al., 2002). Das veränderte LDL-Cholesterin aktiviert lokal Endothelzellen und glatte Muskelzellen der Gefäßwand. Erstgenannte bilden auf ihren Oberflächen Adhäsionsmoleküle aus, insbesondere an den Stellen des arteriellen Gefäßbetts, die hämodynamischem Stress ausgesetzt sind (Dai et al., 2004; Nakashima et al., 1998; Cybulsky et al., 1991). Daraufhin werden aus der inneren Gefäßwand chemotaktische Zytokine („Chemokine“) freigesetzt (Boring et al., 1998), zu denen beispielsweise der „Makrophage Stimulating Factor (MSF)“ (Smith et al., 1995) gehört. Diese Zytokine erleichtern zusammen mit den hochregulierten Adhäsionsmolekülen, insbesondere dem „Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM 1)“ (Cybulsky et al., 1991), den Entzündungszellen, aus dem Blutstrom in die Gefäßwand einzuwandern. Hauptsächlich Monozyten (Smith et al., 1995) und T-Zellen gelangen so an den Ort des Geschehens. Diese beiden Zellgruppen und die Akkumulation von Lipiden in der Intima zeichnen die frühen Läsionen der Gefäße, die „fatty streaks“, aus (Stary et al., 1994). Die Zellen der inneren Gefäßwandschicht und die eingewanderten Entzündungszellen triggern den inflammatorischen Prozess durch direkte und mediatorvermittelte Signalwege. Die Monozyten wandeln sich in ortsständige Makrophagen um und räumen über spezielle Rezeptoren, die Scavenger-Rezeptoren (Peiser et al., 2002) und die Toll-like Rezeptoren (Edfeldt et al., 2002), die angesammelten Lipide ab. Zusätzlich können die Toll-like Rezeptoren bei Aktivierung den entzündlichen Prozess unterstützen. Ihr Fehlen führt zu verminderter Atheroskleroseentstehung (Bjorkbacka et al., 2004). Ist der Abbau der Fette nicht möglich, werden diese intrazellulär in Vakuolen gespeichert. Dabei entstehen Makrophagen, die wegen ihrer zahlreichen Fetttröpfchen „Schaumzellen“ genannt werden.

Schon in frühen Stadien der Atherogenese sind T-Zellen in der Gefäßwand nachweisbar (Sary et al., 1994). Nach derzeitigem Wissensstand erfolgt die primäre Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen in Lymphknoten, indem ihnen dort das zu ihrem T-Zell-Rezeptor spezifisch passende Antigen präsentiert wird. Eine zweite Aktivierung findet lokal am Ort des Entzündungsprozesses statt. Für die Atherogenese konnten allerdings Ort und Antigen der ersten Aktivierung der T-Zellen noch nicht nachgewiesen werden (Robertson et al., 2006). Aus frühen atherosklerotischen Läsionen isolierte T-Zellen sind auf einige Antigene reaktiv, ohne dass ein einzelnes Antigen nachgewiesen ist (Robertson et al., 2006; Hansson et al., 2006). Möglicherweise präsentieren die Monozyten die an der Initialisierung beteiligten, chemisch veränderten Fette den T-Zellen und aktivieren diese dadurch (Jonasson et al., 1986; Kishikawa et al., 1993; Yilmaz et al., 2004).

Die Immunantwort in der Gefäßläsion kann über Zytokine zur Differenzierung von Th1 Helferzellen führen (Frostegard et al., 1999). Diese Zellen bilden in hohem Maße  $IFN\gamma$ , das Makrophagen und Endothelzellen aktivieren kann (Hansson, 2001). Wird im Tiermodell  $IFN\gamma$  oder dessen Rezeptor ausgeschaltet, kommt es zu einer deutlich verminderten Atheroskleroseentstehung (Gupta et al., 1997). Aktivierte T-Zellen können durch weitere Zytokine Kaskaden von Entzündungsprozessen anstoßen (Robertson et al., 2006).

Der Atherosklerose liegt pathophysiologisch also eine nicht selbstlimitierende Entzündung der Gefäßwand zugrunde. Folge dieses Geschehens kann die Entstehung einer Plaque als unregelmäßige, fokale Verdickung der inneren Wandabschnitte sein. Diese zeigt einen typischen Aufbau. Zentral befinden sich extrazelluläre Fette, Débridement sowie Schaumzellen. Dieser Kern ist umgeben von einem Ring aus glatten Muskelzellen, Endothelzellen, extrazellulärer Substanz, Makrophagen (Sary et al., 1995), aktivierten T-Zellen (Hansson et al., 1989) und Mastzellen (Jonasson et al., 1986). Die Entzündungszellen befinden sich vermehrt an den Randbereichen der Plaque, von denen das weitere Wachstum ausgeht (Jonasson et al., 1986; Kovanen et al., 1995). Der Herd wird zur Seite des Gefäßlumens von einer fibrösen Kappe abgetrennt. Diese kann durch die Aktivierung von Makrophagen, Mastzellen und T-Zellen (Hansson et al., 1989), die inflammatorische Zytokine, Koagulationsfaktoren, Radikale, vasoaktive Substanzen und Proteasen freisetzen, degenerieren und die Plaque destabilisieren. Dadurch kann es zum Einriss der Kappe kommen. Als Folge davon werden Gewebe freigelegt und koagulatorische Mediatoren freigesetzt. Die akute Aktivierung des Gerinnungssystems mündet in einem lokalen

Thrombus. Dadurch kann der Blutfluss an dieser Stelle unterbrochen werden. Die Verbindung zwischen einem Entzündungsgeschehen in einer Plaque und lokaler Thrombose ist in Koronargefäßen nachgewiesen (van der Wal et al., 1994).

Häufig ist es kein langsamer Prozess (Hackett et al., 1988), der das Lumen des Gefäßes verschließt, sondern ein akutes Geschehen, wie beispielsweise beim Myokardinfarkt (Falk et al., 1995; Davies, 1996). Atherosklerose kann neben akuten Ereignissen wie Schlaganfall, Herzinfarkt und Verschluss einer Arterie der Extremitäten zu chronisch progredienten Erkrankungen, wie Niereninsuffizienz, peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) und subkortikaler atherosklerotischer Enzephalopathie (SAE) führen.

Das Immunsystem hat auf den atherosklerotischen Prozess nicht nur fördernde, sondern auch inhibitorische Wirkung. Für die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 (Mallat et al., 1999) und TGF $\beta$  ist dies nachgewiesen. Im Tiermodell führt die Ausschaltung von IL-10 (Caligiuri et al., 2003) oder eine Blockade des Signalweges von TGF $\beta$  in T-Lymphozyten (Robertson et al., 2003) zu verstärkter Atherosklerose. Letzteres weist auf eine TGF $\beta$  vermittelte Inhibition der T-zellulären entzündlichen Aktivität hin.

B-Lymphozyten sind ein weiterer Teil des Immunsystems, denen eine potentiell antiatherosklerotische Rolle zugesprochen wird. Antikörper, die von diesen Zellen nach Immunisierung gegen Pneumokokken gebildet werden, können oxidiertes LDL-Cholesterin neutralisieren und so dessen proatherogene Wirkung unterdrücken (Binder et al., 2003). Einer weiteren lymphozytären Zellpopulation, den Regulatorischen T-Zellen (Ait-Oufella et al., 2006), wird ebenfalls ein atheroprotektives Potential zugeschrieben.

Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen dem Inflammationsvorgang in der Gefäßwand und der Entstehung der Atherosklerose ist somit belegt. Derzeit ist unklar, inwieweit dieses Geschehen von pathologisch veränderten humoralen und zellulären Entzündungsparametern im peripheren Blut begleitet ist (Hansson, 2005). Für klinische Stadien der Atherosklerose konnten bereits erhöhte Werte von IL-6 (Biasucci et al., 1996), C-reaktivem Protein (Liuzzo et al., 1994), IL-7, IL-8 (Damas et al., 2003) und Fibrinogen (Wilhelmsen et al., 1984) nachgewiesen werden. Insbesondere das C-reaktive Protein („CRP“) ist in diesem Zusammenhang ausführlich untersucht worden. Man vermutet, dass bereits leicht erhöhte Werte Ausdruck einer so genannten Mikroinflammation sind.

Veränderungen von Entzündungszellen im peripheren Blut bei klinischen Stadien der Atherosklerose sind nachgewiesen. Beispielsweise findet sich beim „Akuten Coronar Syndrom (ACS)“ eine Erhöhung der T-Zellen (Caliguri et al., 2000; Liuzzo et al., 2000). Deren pathophysiologische Rolle ist letztendlich ungeklärt. Veränderungen von humoralen oder zellulären Entzündungsparametern im Blut können also direkt (kausal) oder indirekt (konsekutiv) Ausdruck der Inflammationsvorgänge in der Gefäßwand sein (Hansson et al., 2005).

## **2.2 Intima Media Dicke und Atherosklerose**

Durch eine sonographische Untersuchung im B-Bild-Verfahren kann der Aufbau arterieller Gefäße dargestellt werden (Pignoli et al., 1986; Schulte-Altendorneburg et al., 2001). Im Längsschnitt durch die Arterie sind die beiden begrenzenden Wände und das Lumen zu sehen. Die beiden inneren Schichten jeder Wand erzeugen dabei typische Signale. Diese bestehen aus zwei aneinander liegenden Linien. Das hyperintense Signal der inneren, luminal gelegenen Linie entsteht an der Tunica Intima, während die extraluminale Linie ein hypointenses Signal aufweist, welches durch die Tunica Media hervorgerufen wird. Der Durchmesser jedes einzelnen Signals gibt das histologische Maß der korrespondierenden Wandschicht nicht wider. Die beiden Linien zusammen entsprechen jedoch dem histologischen Diameter beider Wandschichten (Pignoli et al., 1986; Schulte-Altendorneburg et al., 2001) und ermöglichen damit Aussagen über den Aufbau der Gefäßwand. Dieses Maß wird „Intima Media Dicke“ (IMT) genannt.

Aufgrund ihrer oberflächlichen Lage ist die Arteria Carotis für eine sonographische Untersuchung besonders geeignet. Der Intima Media Komplex kann dort einfach, präzise und reproduzierbar dargestellt werden (Kanters et al., 1997; Bots et al., 2007). Bereits frühe Stadien des atherosklerotischen Prozesses können so sichtbar gemacht werden (Persson et al., 1994; Grobbee et al., 1994; de Groot et al., 2004).

Die IMT der Arteria Carotis wird als Marker für generalisierte Arteriosklerose angesehen (Bots et al., 2007; Grobbee et al., 1994; de Groot et al., 2004). Zusammenhänge mit atherosklerotischen Risikofaktoren sind nachgewiesen. Bei weiteren wissenschaftlichen

Fragestellungen wird die IMT herangezogen. Dazu gehören Untersuchungen zu möglichen atherosklerotischen Risikofaktoren, die Abschätzung des Risikos kardio- und zerebrovaskulärer Ereignisse (Lorenz et al., 2007 a) und die Verwendung als Surrogatmarker in therapeutischen Studien (Agewall et al., 1994; Amarenco et al., 2004).

Die IMT der Arteria Carotis kann auf verschiedene Arten ermittelt werden. Einige Untersuchungen beschränken sich auf eine der Karotiden, während andere beide Karotiden einbeziehen. Zusätzlich kann die IMT an drei verschiedenen Gefäßabschnitten, der Arteria Carotis Communis (ACC), der Arteria Carotis Interna (ACI) und der Bifurcatio Arteriae Carotis (BIF), und dort wiederum an der schallkopfnahen und/oder der schallkopffernen Gefäßwand bestimmt werden. Des Weiteren wird die IMT jeder Gefäßwand entweder als Mittelwert mehrerer Messungen oder als Maximum angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die IMT an beiden Karotiden in plaquefreien Abschnitten der schallkopffernen Wand bestimmt. Dieses Verfahren ist gerechtfertigt und das derzeit etablierte (Bots et al., 2007). Die Wand der Arteria carotis communis ist deutlich besser und reproduzierbarer darzustellen als die der beiden distalen Gefäßabschnitte, die BIF und die ACI (Kanters et al., 1997; Espeland et al., 1996). Außerdem ist eine Überlegenheit anderer Messverfahren gegenüber der Bestimmung der IMT der ACC nicht belegt. Die Bestimmung der IMT erfolgte an plaquefreien Abschnitten, da diese das Maß der generellen Atherosklerose am besten repräsentieren (Lorenz et al., 2007 b). Als Plaque wurde eine umschriebene Verdickung der IMT ab 1,2 mm definiert. Dieser Grenzwert ist in anderen Studien ebenfalls verwendet worden (Bots et al., 2002).

### **2.3 Periphere Lymphozyten als zelluläre Marker subklinischer Atherosklerose**

Für eine Reihe von atherosklerotischen Risikofaktoren ist eine Assoziation mit der IMT nachgewiesen worden. Dies gilt insbesondere für die klassischen Risikofaktoren, allerdings sind auch Zusammenhänge mit anderen Faktoren bekannt (Simon et al., 2002).

Der Zusammenhang zwischen humoralen Inflammationsmarkern und Atherosklerose ist intensiv untersucht worden (Tanigawa et al., 2003). Dagegen sind zelluläre Bestandteile des

peripheren Blutes bisher unzureichend berücksichtigt, obwohl deren pathogenetische Relevanz in der Atherogenese gesichert ist (Hansson, 2005). Dies gilt auch für eine Assoziation von zirkulierenden Lymphozytenpopulationen und subklinischer Atherosklerose.

Es sind sowohl proatherosklerotische als auch antiatherosklerotische Eigenschaften verschiedener Lymphozytensubpopulationen nachgewiesen (Stary et al., 1994; Emeson et al., 1988; Hansson, 2005; Robertson et al., 2006). Vergleichbar mit klassischen Risikofaktoren kann daher eine Assoziation zwischen Lymphozytensubpopulationen und atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen schon in frühen Stadien der Atherosklerose vermutet werden.

Diese Fragestellung wird mit der vorliegenden Arbeit erstmalig aufgegriffen. Es soll eine Assoziation zwischen Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes und der mittleren IMT der beiden Arteriae Carotes Communes als Surrogatmarker atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen untersucht werden. Dazu wurde der sonographische Durchmesser des Intima Media Komplexes der Arteriae Carotes Communes bei einem gesunden Kollektiv (411 TeilnehmerInnen) mit niedrigem atherosklerotischen Risiko ermittelt. Aus Blutproben jedes Studienteilnehmers erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen die Bestimmung der Zellzahl verschiedener Lymphozytensubpopulationen.

Zusammenhänge zwischen peripheren Lymphozytensubpopulationen und atherosklerotischen Veränderungen können sowohl durch direkte Beteiligung an den Entzündungsvorgängen im Gefäßbett als auch indirekt als Ausdruck eines allgemeinen Entzündungsgeschehens bestehen. Es kann postuliert werden, dass erhöhte Zahlen proinflammatorischer Lymphozytensubpopulationen mit erhöhten IMT-Werten - als Ausdruck atherosklerotischer Gefäßveränderungen - assoziiert sind. Andererseits ist eine Assoziation von antiinflammatorischen Lymphozyten des peripheren Blutes mit niedrigen IMT-Werten anzunehmen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Reagenzien und Medien, die Verbrauchsmaterialien, die eingesetzten Geräte und die Antikörper tabellarisch aufgeführt.

Reagenzien, Medien, Puffer und Chemikalien:

Bezeichnung	Inhalt	Inhalt	Menge	Hersteller
FACS-Puffer	BSA (Albumine Bovine Fraction IV)		2,5 g	SERVA, Heidelberg
		NaN3 10 %	3,5 ml	
		PBS	100 ml	Linaris, Wertheim-Bettingen
		NaN3	10 g	
	FCS (fetales Kälberserum)		25 ml	PAA, Pasching
PBS (Dulbecco`s Phosphat Puffer)		ad 500 ml (bei 56 ° C gelöst)	Linaris, Wertheim-Bettingen	
Lysing-Solution	Lysing solution (Konzentrat)		50 ml	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
	Auqua injectabile		450 ml	Braun, Melsungen
PFA (Paraformaldehyd)	1% PFA 4 %		25 ml	
		PFA	8 g	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
		PBS	200 ml	Linaris, Wertheim-Bettingen
		PBS	75 ml	Linaris, Wertheim-Bettingen

Tab. 1: Reagenzien, Medien, Puffer und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien:

Bezeichnung	Hersteller
FACS-Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Pipettenspitzen (1 ml, 2 ml, 5 ml) für Kolbenhubpipetten	BD, Heidelberg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner, Frickenhausen
Lithium-Heparin Monovette 4,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serum-Gel Monovette 4,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sonographiegel	Sonogel, Roche
Sheat fluid	Dako Cytomation, Hamburg
Filterpipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Kolbenhubpipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl)	Abimed, Langenfeld

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer (FACScalibur)	BD, Heidelberg
Eisflockenmaschine	Tepa, Barbüttl
Megafuge 1,0 R	Heraeus Instruments, Harnau
Sterile Werkbank HB2472	Heraeus Instruments, Harnau Vortex Mixer
Vortex Mixer K	neoLab, Heidelberg
Sonographiegerät „Sonoline Sienna“	Siemens, Erlangen
Blutdruckmanschette	Firma Erka, Bad Tölz
Gefrierschrank – 20 °C	Bosch, Stuttgart
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Stuttgart
Feinwaage Ohaus	Ohaus Corporation, Florham Park
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
ph-Meter CG 825	Schott, Mainz
Spannungsquelle Consort E452	UniEquip, Martinsried
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn

Tab. 3: Geräte

Antikörper:

Antikörper	Klon	Hersteller
CD3FITC/CD16CD56PE	SK7/ B73.1/ MY31	BD, Heidelberg
CD19PerCP	SI25C1	BD, Heidelberg
CD4PE	RPA-T4	BD, Heidelberg
CD8PerCP	SK1	BD, Heidelberg
CD3APC	SK7	BD, Heidelberg
CD28FITC	15E8(CLB-402)	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 4: Antikörper

### 3.2 Studienteilnehmer

Im Zeitraum vom 01.09.2004 bis 30.09.2005 wurden 411 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes in die Studie eingeschlossen. Im Rahmen einer regelmäßigen Vorstellung beim Betriebsarzt sprach dieser die Teilnehmer an.

Es galten folgende Einschlusskriterien:

- Gesunde weibliche und männliche Personen im Alter von 25 Jahren bis 59 Jahren
- Schriftliche Einwilligungserklärung

Es galten folgende Ausschlusskriterien:

- stattgehabter Herzinfarkt, Bypass-Operation oder PTCA/Koronarstent
- Operationen oder Dilatation einer Halsschlagader, einer Bein- oder Beckenarterie
- chronische Entzündung oder bestehende maligne Tumorerkrankung
- Beschwerdesymptomatik im Sinne einer Angina Pectoris oder pAVK
- stattgehabte cerebrale Durchblutungsstörungen (TIA – Symptomatik oder PRIND), Schlaganfall, Amaurosis fugax
- aktuelle systemische immunsuppressive Therapie
- fieberhafter Infekt bis 5 Tage vor Studienteilnahme
- fortgeschrittene chronische Nierenerkrankung (errechnete glomeruläre Filtrationsrate  $< 30\text{ml}/(\text{min} \times 1,73 \text{ m}^2)$ )

### 3.3 Studienablauf

Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Universitätsklinikums wurden im Rahmen der regelmäßigen Vorstellungen beim Betriebsarzt bezüglich einer Teilnahme an der Studie angesprochen und aufgeklärt. Bei den betriebsärztlicherseits notwendigen Blutentnahmen wurden für die Studie zusätzliche Proben entnommen. Die Entnahme erfolgte werktags zwischen 08:00 Uhr und 12:00 Uhr. Jeweils ein 4,7 ml Lithium-Heparin- und ein 4,7 ml Serum-Gel-Röhrchen wurden, mit den Probandendaten versehen, sofort in Eis eingebracht. Nach einer Lagerungszeit von einer bis fünf Stunden erfolgten die Aufbereitung der Blutproben und die durchflusszytometrische Messungen am Entnahmetag. Im Regelfall wurden am gleichen Tag die Untersuchungen der Intima-Media-Dicke der Arteria Carotis Communis, die Beantwortung des Studienfragebogens und die Blutdruckbestimmung nach Riva Rocci (auf Vielfache ganze Zahlen von „5“ auf- oder abgerundet, jeweils einmalig am linken und rechten Oberarm) und Pulsmessung (palpatorisch an der Arteria radialis) durchgeführt. Der Fragebogen umfasste: pAVK-, AP- oder Apoplex/TIA/PRIND- typische Beschwerden, Interventionen jeglicher Art im Bereich des arteriellen Gefäßsystems, fieberhafter Infekt innerhalb der letzten fünf Tage vor Blutentnahme, Raucheranamnese (mindestens ein Zigarette innerhalb der vier Wochen vor Studienteilnahme), familiäres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Herzinfarkt und/oder Schlaganfall der Eltern und/oder Geschwister vor deren 60. Lebensjahr), bekannter Diabetes mellitus, sportliche Aktivität, bekannte Nierenerkrankungen, Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme vor Blutentnahme, Medikamenten- und Alkoholanamnese, Größe und Gewicht. Der Fragebogen ist im Anhang abgebildet.

Waren die Anamneseerhebung, Blutdruck- und Pulsbestimmung und die sonographische Untersuchung nicht im direkten Anschluss an den Betriebsarztbesuch möglich, wurde dies innerhalb von vier Wochen nach der Blutentnahme durchgeführt.

### 3.4 Messung der Intima Media Dicke mittels Sonographie

Zur Erzeugung eines Ultraschallsignals werden an Kristallen elektrische Impulse durch den so genannten piezoelektronischen Effekt in Wellen umgewandelt, die im medizinischen Bereich meist Frequenzen zwischen 1 bis 40 MHz bei einer mittleren Schallintensität von 100

mW/cm<sup>2</sup> aufweisen. Die Ultraschallsonde dient dabei gleichzeitig als Sender und Empfänger. Der Schall wird beim Auftreffen auf die Grenzfläche zweier Materialien unterschiedlicher Impedanz (unterschiedlichen Schallwiderstandes) umso stärker reflektiert, je größer deren Differenz ist. Bei bekannter Laufgeschwindigkeit in den geschallten Geweben ist über die Zeit zwischen dem Entsenden und dem Empfangen der Wellen eine Tiefenlokalisierung des Reflexionsortes möglich. Die rechnergestützte graphische Darstellung stellt Orte starker Reflexion entsprechend ihrer Intensität weiß (echoreich) dar, während bei wenig bis fehlender Reflexion der Reflexionsort entsprechend dunkler bis schwarz (echoarm) abgebildet wird. So entsteht ein zweidimensionales Schnittbild (B-Bild). Hohe Frequenzen führen dabei zu einer guten Ortsauflösung und geringen Eindringtiefe, während dies bei tiefen Frequenzen umgekehrt ist.

Die Tunica Intima und die Tunica Media stellen zusammen sonographisch charakteristische Strukturen dar. Von intra- nach extraluminal tritt zuerst eine (weiße) echoreiche Linie auf, hier befindet sich der Übergang von dem Gefäßinneren und der Intima (siehe Abbildung). Direkt darunter liegt eine echoarme, im B-Bild schwarze Linie, der wieder eine echoreichere Zone folgt. Diese Strukturen markieren den Übergang der Grenzfläche zwischen Media und Adventitia. Die lumennahe echoreiche und die anliegende echoarme Linie bilden zusammen den Intima-Media-Komplex. Dessen Durchmesser korreliert sehr gut mit dem histologisch gemessenen Durchmesser der beiden inneren Gefäßwandschichten (Pignoli et al., 1986; Schulte-Altendorf et al., 2001). Die Darstellung der einzelnen drei Schichten eines arteriellen Gefäßes (Tunica Intima, Tunica Media, Tunica Adventitia) mit der Wiedergabe des histologischen Durchmesser ist sonographisch nicht möglich. An der Arteria carotis communis gelingt die bessere Darstellung des Intima-Media-Komplexes an dem tiefer liegenden Abschnitt der Gefäßwand, der im B-Bild weiter vom Schallkopf entfernt liegt (Abb. 1). Die oberflächennahe Gefäßwand lässt sich sonographisch schlechter abbilden.

Der mit der Untersuchung betraute Doktorand wurde während einer zweiwöchigen Übungsphase vor Beginn der Studie an freiwilligen Probanden eingearbeitet. Für die sonographische Untersuchung wurden die Probanden auf dem Rücken mit leicht überstrecktem Kopf gelagert. Standardisiert wurde mit der Untersuchung der linken Arteria carotis communis begonnen. Zur Unterscheidung der Arteria carotis communis von venösen Halsgefäßen wurden die Komprimierbarkeit der Venen, die parathyreoidale Lage des arteriellen Gefäßes medial der Vena jugularis interna und die Bifurkation nach der bulbären

Erweiterung des Gefäßes herangezogen. Die Arterie wurde in sagitaler Schnittführung so dargestellt, dass der Intima-Media-Komplex bei einem, zwei und drei Zentimetern vor dem Bulbusbeginn gemessen werden konnte. Der Beginn des Bulbus, der sonographisch durch ein Auseinanderweichen der Wände zu identifizieren ist, wurde im Längsschnitt direkt an den linken Bildrand gelegt oder durch ein X markiert. Waren die drei Messpunkte nicht in einem Bild darstellbar, wurden bis zu drei Aufnahmen angefertigt, um eine optimale Darstellung des Intima-Media-Komplexes am vorgesehenen Messpunkt zu erreichen. Die sonographische Untersuchung wurde mit dem Ultraschallgerät „Sonoline Sienna“ der Firma Siemens durchgeführt. Der verwendete Schallkopf hatte eine Frequenz von 7,5 MHz. Die Darstellung erfolgte ausschließlich im B-Bild Verfahren.

Die Vermessungen des IMT-Komplexes am gespeicherten B-Mode-Bild wurden von dem betreuenden Arzt der Studie geblindet durchgeführt. Die horizontalen Balken der beiden kreuzförmigen Cursor wurden mittig auf dem Lumen-Intima- und auf dem Media-Adventitia-Übergang platziert. Hierbei wurde die kürzeste Distanz zwischen den horizontalen Balken gewählt. Das Sonographiegerät berechnete den Abstand der beiden Curser. Die Abbildungen der Gefäßwand der Probanden konnten anhand der Initialen und des Untersuchungszeitpunktes, die dargestellte Gefäßseite anhand einer Kennzeichnung (LI = links, RE = rechts) eindeutig zugeordnet werden. Die Messung war auf plaquefreie Abschnitte beschränkt. Als Plaque galt eine lokale Verdickung der IMT ab 1,2 mm. An jeder der beiden Karotiden wurden an drei definierten Messpunkten (bei 30 mm, 20 mm und 10 mm vor der Bifurkation) die IMT bestimmt, so dass sich insgesamt sechs Messwerte ergaben (Abb. 1). Aus diesen wurde die mittlere IMT berechnet.

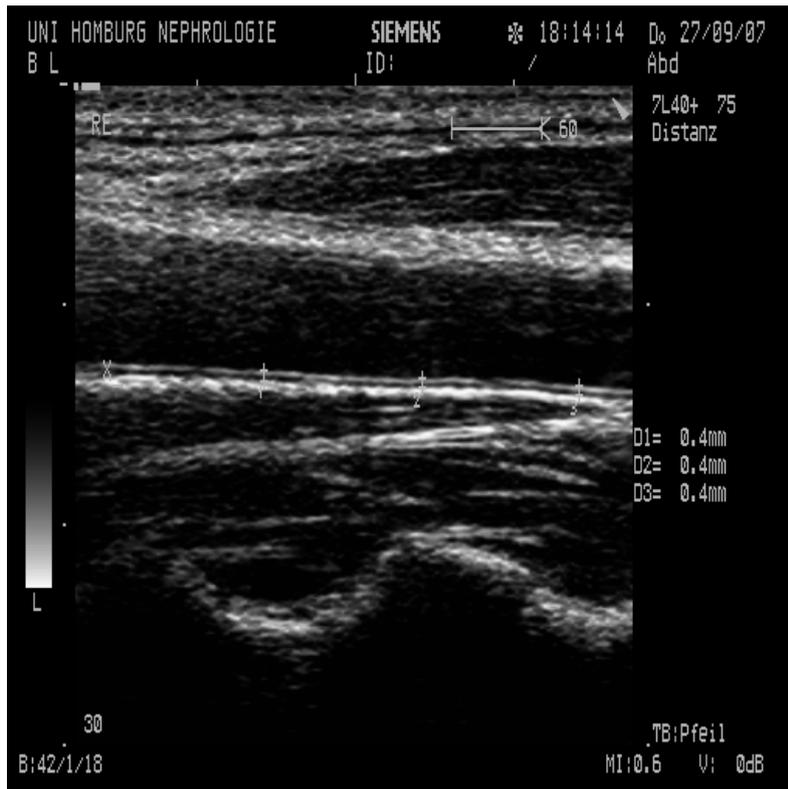


Abb. 1: Beispielhafte Darstellung des B-Bildes zur Messung der IMT

### 3.5 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein optisches Meßsystem zur Untersuchung von Zellen. Es besteht aus drei Komponenten: einem Flüssigkeitssystem, einer Optik und einer Elektronik. Die Zellen, die von einer Trägerflüssigkeit (sheat fluid) umgeben sind, befinden sich in einem Flüssigkeitsstrom in einer sich verjüngenden Messküvette. Dabei vergrößert die Beschleunigung des Flusses den Abstand der Zellen voneinander, ohne dass sich die beiden Ströme mischen (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen werden einzeln durch Laserstrahlen geführt, die Teil der Optik sind. Hierbei entsteht Streulicht. Die gerade Streuung (Forward Scatter, FSC; Absorption durch die Zelle) ist ein Maß für die Zellgröße, die seitliche Streuung (Side Scatter, SSC; Beugung) für die Dichte und Granularität der Zellen. Zusätzlich kann der Laser einen an einen Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von Licht typischer Wellenlänge anregen. Dieser spezifische Antikörper kann beispielsweise gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen (CD, cluster of differentiation) gerichtet sein (Abb. 2). Durch verschiedene Kombinationen von Antikörpern (FACS-Färbung) gelingt eine genaue Charakterisierung spezifischer Zellen. Die Intensität des

emittierten Lichts ist ein Maß für die Oberflächenexpressionsdichte, also der markierten Oberflächenantigene pro Zelle.

Das Ergebnis der Lichtstreuung durch die einzelnen Zellen wird über ein Computerprogramm (CellQuestPro) ausgewertet und als Dot Plot (Frequenz der Zellen) bzw. Histogramm (Mittlere Expressionsdichte pro Zelle) dargestellt. Um die zu untersuchende Zellpopulation wird dann ein Gate (Eingrenzung) gelegt und die unerwünschten Zellen aus der Auswertung ausgegrenzt. Die gegateten Zellen können dann bezüglich der Expression der markierten Oberflächenantigene weiter untersucht werden.

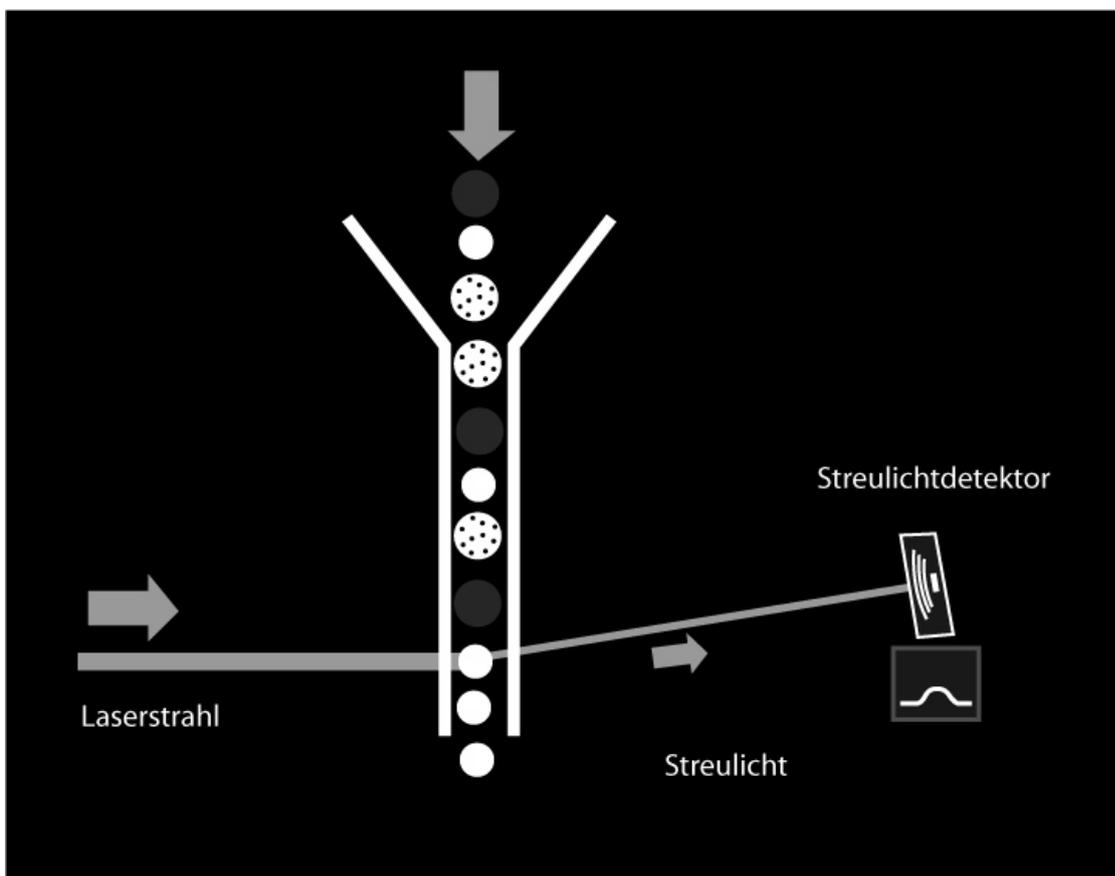


Abb. 2: Prinzip der Durchflusszytometrie

### 3.6 Standardisierte Vollblut Oberflächenfärbung

Die Analyse der Lymphozyten (T-Lymphozytenpopulationen, NK- und B-Lymphozyten) anhand spezifischer Oberflächenantigene erfolgte aus heparinisiertem Vollblut mittels Durchflußzytometrie. Für jeden Probanden wurden jeweils 100 µl Vollblut in FACS-

Röhrchen pipettiert. Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper-Ansätze (Tab. 5) wurden die Proben für zehn Sekunden gevortext und dann 30 min bei 4° Celsius im Kühlschrank inkubiert (Färbung). Die bei der durchflusszytometrischen Messung störenden Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml Lysing Solution und anschließende 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln lysiert. Nach Pelletierung (1300 rpm, 4°C) wurden die Zellen mit 2 ml FACS Puffer gewaschen. Nach erneuter Pelletierung (1300 rpm, 4°C) erfolgte durch Zugabe von 200 µl 1 % PFA-Lösung eine Fixierung. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4°C gelagert.

	Antikörper	Menge
NK/B-Lymphozyten-Färbung	CD3/CD56CD16 – Mix	6 µl
	CD19	4 µl
T-Lymphozyten-Färbung	CD28	2 µl
	CD4	4 µl
	CD8	4 µl
	CD3	0,5 µl

Tab. 5: Färbeschema zur FACS-Analyse der Lymphozytenpopulationen

### 3.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der CELLQuest ProSoftware (Becton Dickenson). Diese kann jeder Zelle die Eigenschaften zuordnen, die über das oben beschriebene optische System erfasst werden. In der DotPlot Darstellung werden die Ergebnisse in einem zweidimensionalen Koordinatensystem abgebildet. Verschiedene Merkmale können so beobachtet werden. Das Programm gibt bei der Auswertung die Anteile der einzelnen durch den Untersucher definierten Zellgruppen an der übergeordneten Population an. Mit Hilfe eines bekannten Blutbilds und Differentialblutbilds lassen sich die absoluten Zellzahlen berechnen.

Im ersten Schritt wurden alle lymphozytären Zellen anhand ihrer Größe und Granularität im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter charakterisiert (Abb. 3). Im folgenden Schritt wurden anhand von Oberflächenmerkmalen drei Subpopulationen der Lymphozyten unterschieden (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) und diese dann in zwei DotPlots nach CD3/CD19- und CD3/CD56/16- Expression aufgetrennt.

Ein zweiter Ansatz diente der weiteten Differenzierung der T-Lymphozyten (Abb. 4). Im ersten Schritt dieser Auswertung wurden die T-Lymphozyten anhand der Größe und Granularität und der CD3 Expression bestimmt. Die T-Lymphozyten wurden unterschieden in CD4+ Helferzellen und CD8+ Suppressorzellen und diese beiden Populationen durch das Oberflächenmerkmal CD28 weiter unterteilt. Mit Hilfe des Blutbildes und des Differentialblutbildes können absolute Zellzahlen berechnet werden. Das Vorgehen wird im Folgenden graphisch verdeutlicht.



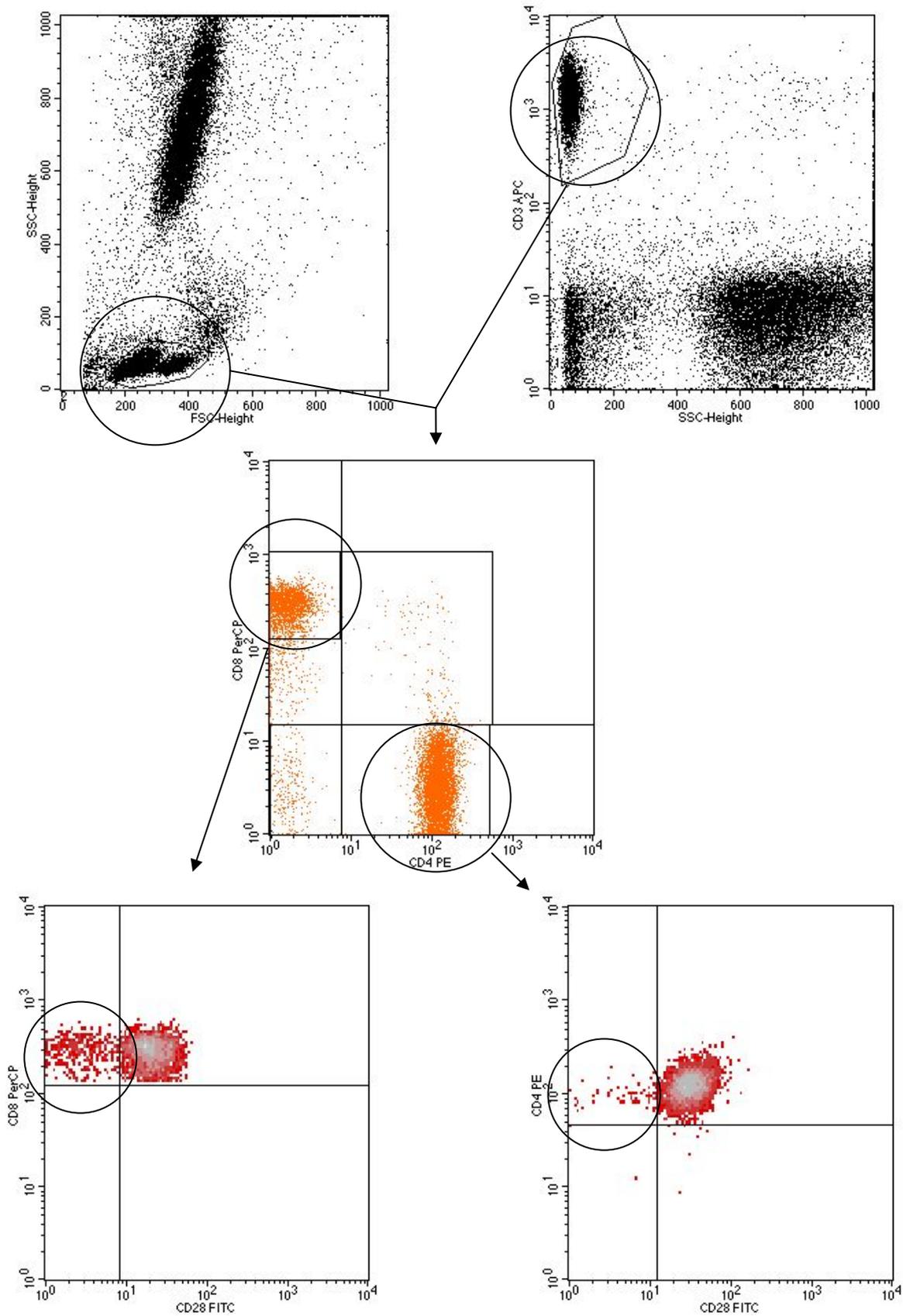


Abbildung 4: Gatingstrategie zur Bestimmung der CD4+ T-Lymphozyten, CD8+ T-Lymphozyten, der CD4+CD28- T-Lymphozyten und der CD8+CD28- T-Lymphozyten

Die absoluten Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen werden folgendermaßen berechnet:

- Berechnung der NK-, B- und T-Lymphozyten:  
 $(\text{Leukozyten}/\mu\text{l}) \times (\% \text{ Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten im Differentialblutbild}) \times (\% \text{ Anteil der B-, NK- oder T-Zellen an den Lymphozyten aus dem ersten Ansatz}) = (\text{absolute Zellzahl der B-, NK- oder T- Lymphozyten}/\mu\text{l})$
- Berechnung der CD4+ und der CD8+ T-Lymphozyten:  
 $(\text{Leukozyten}/\mu\text{l}) \times (\% \text{ Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten im Differentialblutbild}) \times (\% \text{ Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten aus der Auswertung des ersten Ansatzes}) \times (\% \text{ Anteil der CD4+ oder der CD8+ Zellen an den T-Lymphozyten aus dem zweiten Ansatz}) = (\text{absolute Zellzahl der CD4+ T-Lymphozyten oder CD8+ T-Lymphozyten}/\mu\text{l})$
- Berechnung der Zellzahl der CD4+CD28- und CD8+CD28- T-Lymphozyten:  
 $(\text{Anteil der CD4+CD28- an den an den CD4+ T-Lymphozyten oder Anteil der CD8+CD28- T-Lymphozyten an den CD8+ T-Lymphozyten aus dem 2. Ansatz}) \times (\text{Anzahl der absoluten CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten}/\mu\text{l}) = (\text{absolute Zellzahl der CD4+CD28- oder der CD8+CD28- T-Lymphozyten}/\mu\text{l})$

### 3.8 Bestimmung weiterer Laborparameter

Die Bestimmung der Laborparameter erfolgte im klinisch chemischen Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Es wurden folgende Parameter bestimmt:

- Blutbild und Differentialblutbild
- Klinische Chemie: Transaminasen,  $\gamma$ -GT, Gesamtbilirubin, Kreatinin, Glukose, Harnsäure, Albumin, CRP, Cholesterine (Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin), Triglyceride
- Spontanurin auf Urin-Albumin, Urin-Gesamtprotein, Urin-Kreatinin
- Urinstatus mittels Teststreifen, Urin-Sediment

### 3.9 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Folgende Computerprogramme wurden zur Erstellung der vorliegenden Arbeit verwendet:

PC-Programm	Anwendungsbereich
Microsoft Word	Textverarbeitung, Grafiken
Microsoft Excel	Datenverwaltung
SPSS 13.0	Statistik und Grafiken
CellQuest Pro	Durchflusszytometrische Datenerfassung (Messung und Auswertung), Grafiken

Tab. 6: verwendete Computerprogramme

Die Daten eines jeden Studienteilnehmers wurden in eine Excel-Tabelle aufgenommen. Kontinuierliche Variablen werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben und mittels Mann-Whitney-Test verglichen, nominale Variablen werden als prozentuale Anteile der Grundgesamtheit angegeben.

Zusammenhänge zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mittels Spearman-Rho Rangkorrelation überprüft, die nominalen Risikofaktoren wurden mittels Mann-Whitney-Tests in Bezug auf die IMT verglichen. In linearen Regressionsmodellen wurden diejenigen Lymphozytensubpopulationen, die univariat signifikant mit der IMT korrelierten, und klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren als unabhängige Prädiktoren der abhängigen Variable IMT überprüft. Das Signifikanzniveau aller Tests wurde bei 5 % festgesetzt. Die statistische Datenverarbeitung erfolgte mittels SPSS 13.0 (SPSS Inc., USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakteristika der Studienteilnehmer

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien konnten 411 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Universitätskliniken des Saarlandes, die im Rahmen einer routinemäßigen Vorstellung beim Betriebsarzt rekrutiert wurden, in die Studie eingeschlossen werden. 271 Probanden waren weiblich (65,9 %). Das Durchschnittsalter betrug  $42,4 \pm 8,9$  Jahre. Die Tabellen 7 und 8 geben die Charakterisierung der Teilnehmer hinsichtlich des kardiovaskulären Risikoprofils und der Leukozytensubpopulationen wider.

Eigenschaft	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung resp. Prozentzahl	Streubreite des Parameters
Weibliche Studienteilnehmer (%)	65,9	
Alter (Jahre)	$42,4 \pm 8,9$	25-59
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$25,2 \pm 4,3$	17,6-43,7
Gesamtcholesterin (mg/dl)	$198 \pm 38$	100-313
LDL-Cholesterin (mg/dl)	$112 \pm 35$	39-238
HDL-Cholesterin (mg/dl)	$68 \pm 17$	28-135
Blutzucker (mg/dl)	$93 \pm 21$	47-274
Kreatinin (mg/dl)	$0,88 \pm 0,18$	0,5-2,4
Systolischer Blutdruck (mmHg)	$132 \pm 20$	90-225
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	$84 \pm 10$	55-120
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	$100 \pm 12$	70-152
Pulsdruck (mmHg)	$48 \pm 13$	25-110
Aktive Raucher %	30,4	
Diabetes mellitus %	2,7	
Familiäre Belastung durch die Eltern und/oder die Geschwister %	17,0	
Antihypertensive Medikation %	10,2	
Cholesterinsenkende Medikation %	0,5	
IMT (mm)	$0,429 \pm 0,008$	0,22-0,93

Tab. 7: Charakterisierung der Studienteilnehmer

Zellpopulation	Mittelwert±Standardabweichung (Zellzahl/ $\mu$ l)	Streubreite des Parameters (Zellzahl/ $\mu$ l)
Leukozyten	6747±1843	2800-14200
Neutrophile Granulozyten	3938±1470	1330-12070
Monozyten	489±167	148-1530
Lymphozyten	2129±593	732-4816
B-Lymphozyten	232±104	38-589
NK-Zellen	322±154	33-1223
T-Lymphozyten	1475±468	449-3513
CD4+ T-Lymphozyten	919±319	334-2181
CD4+CD28- T-Lymphozyten	21±40	0-315
CD8+ T-Lymphozyten	469±221	94-1746
CD8+CD28- T-Lymphozyten	151±158	1-1158

Tab. 8: Darstellung der Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen

## 4.2 Assoziation der Intima Media Dicke mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Die mittlere IMT wurde anhand je dreier Messpunkte der rechten und der linken Arteria carotis communis bestimmt. Es wurde ein Zusammenhang mit folgenden atherosklerotischen Risikofaktoren untersucht: Alter, Geschlecht, Blutdruck (systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck, mittlerer Blutdruck, Pulsdruck), Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin, Body Mass Index (BMI), familiäre Belastung mit kardiovaskulären Ereignissen vor dem 60. Lebensjahr, Diabetes mellitus und Rauchen. Mit Ausnahme des Rauchens und der familiären Belastung sind für alle Risikofaktoren signifikante Assoziationen mit der IMT nachweisbar. Das LDL-Cholesterin und das HDL-Cholesterin lagen bei drei bzw. bei einem der 411 Probanden nicht vor.

Das Alter zeigt die stärkste Korrelation aller Risikofaktoren mit der IMT ( $r = 0,552$ , Abb. 5). Die zweitstärkste Korrelation mit der IMT weist der systolische Blutdruck ( $r = 0,417$ , Abb. 7) auf; die Zusammenhänge der IMT mit dem Pulsdruck, dem diastolischen und dem mittleren Blutdruck sind signifikant (Abb. 8-10). Der Body Mass Index korreliert ebenfalls positiv ( $r =$

0,306, Abb. 6). Die Assoziationen der IMT mit verschiedenen Cholesterinfraktionen sind schwächer aber signifikant ausgeprägt. Für das Gesamt- und das LDL-Cholesterin sind die Koeffizienten mit  $r = 0,219$  bzw.  $r = 0,218$  etwa gleich groß (Abb. 11-12). Das atheroprotektive HDL-Cholesterin korreliert negativ mit der IMT ( $r = -0,125$ , Abb. 13).

Bei den nominalen Riskofaktoren fanden sich ebenfalls signifikante Assoziationen mit der IMT. Männer haben signifikant höhere IMT-Werte als Frauen ( $0,442 \pm 0,094$  mm vs  $0,422 \pm 0,075$  mm, Abb. 14). Teilnehmer mit bekanntem Diabetes mellitus weisen eine signifikant höhere IMT als Nichtdiabetiker auf ( $0,468 \pm 0,082$  mm vs  $0,428 \pm 0,078$  mm, Abb. 16). Keine Unterschiede ergibt der Vergleich zwischen Probanden mit und ohne familiäre Belastung mit vorzeitigen kardiovaskulären Ereignissen ( $0,443 \pm 0,091$  mm vs  $0,426 \pm 0,08$  mm, Abb. 17). Aktive Raucher unterscheiden sich nicht signifikant in Bezug auf die IMT von Nichtrauchern ( $0,426 \pm 0,075$  mm vs  $0,430 \pm 0,085$  mm, Abb. 15).

Für 408 Studienteilnehmer liegt das C-reaktive Protein (CRP) vor. Allerdings wurde durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes während der Studiendurchführung der ausgegebene untere Grenzwert herabgesetzt. Bei 204 Probanden, die zu Beginn eingeschlossen wurden, betrug der vom Labor ausgegebene untere Grenzwert 3 mg/l, bei den folgenden 161 Teilnehmern 0,6 mg/l. Das hoch sensitive (hs)-CRP, dessen unterer Grenzwert bei 0,2 mg/l liegt, konnte bei 43 Probanden bestimmt werden. Um einen proatherosklerotischen mikroinflammatorischen Entzündungsprozess nachzuweisen, sind 3 mg/l als unterer Grenzwert nicht ausreichend. Die Population der Probanden, bei denen das hs-CRP bestimmt wurde, ist mit 43 Teilnehmern zu klein, um daraus Aussagen über den Zusammenhang mit der IMT abzuleiten.

Bei den 161 Teilnehmern, deren CPR ab einem unteren Grenzwert von 0,6 mg/l vorliegt, korreliert die IMT nicht signifikant mit diesem Entzündungsparameter ( $r=0,130$ ,  $p=0,101$ ).

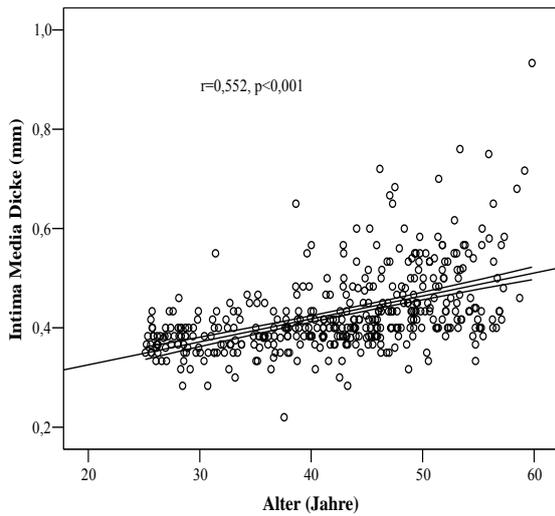


Abb. 5: Korrelation der IMT mit dem Alter (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

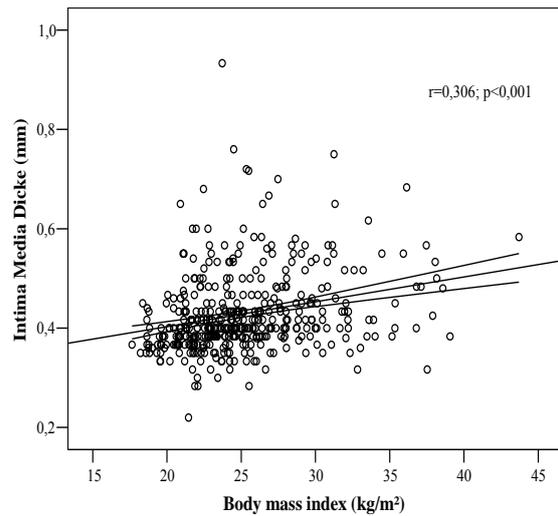


Abb. 6: Korrelation der IMT mit dem BMI (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

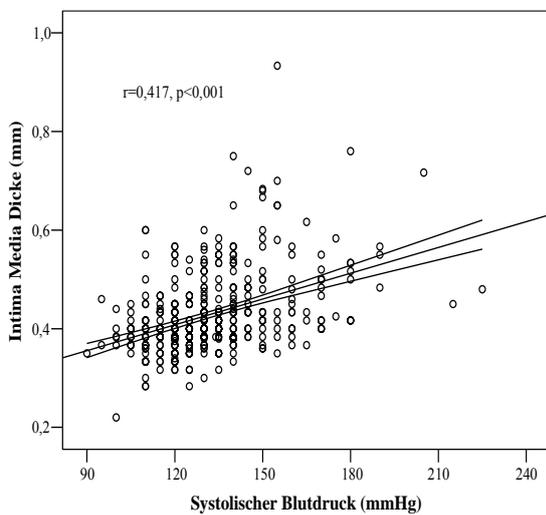


Abb. 7: Korrelation der IMT mit dem systolischen Blutdruck (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

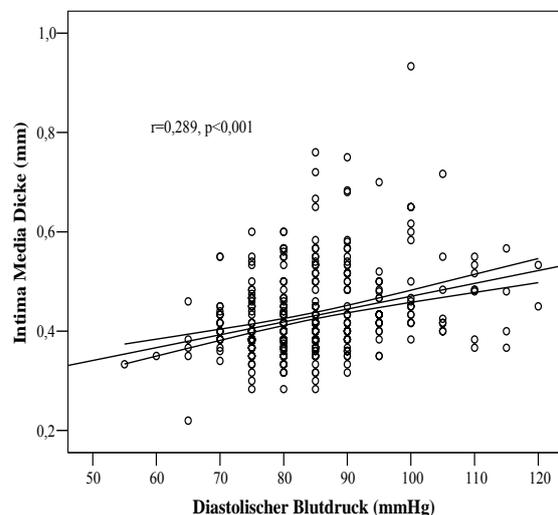


Abb. 8: Korrelation der IMT mit dem diastolischen Blutdruck (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

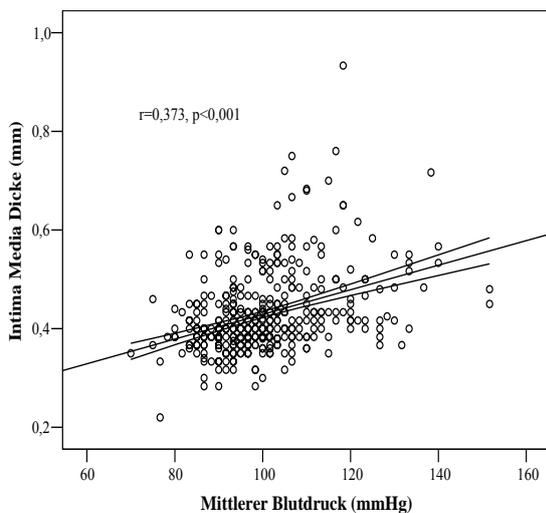


Abb. 9: Korrelation der IMT mit dem mittleren Blutdruck (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

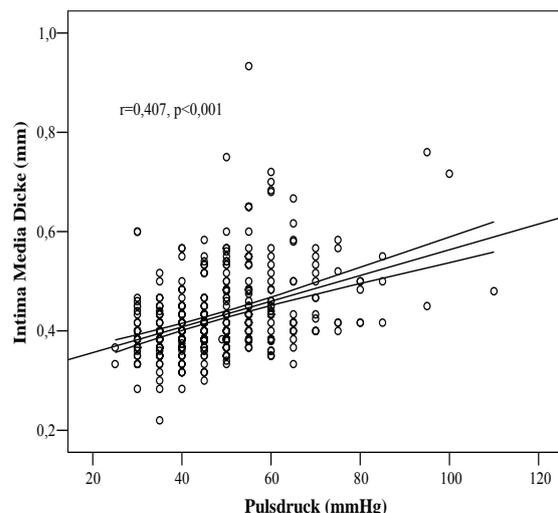


Abb. 10: Korrelation der IMT mit dem Pulsdruck (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

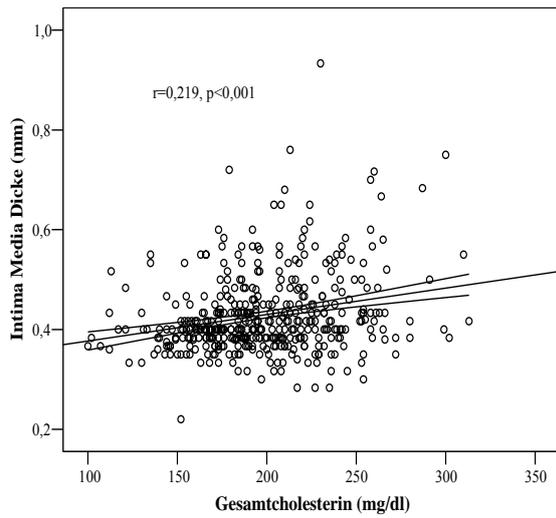


Abb. 11: Korrelation der IMT mit dem Gesamtcholesterin (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

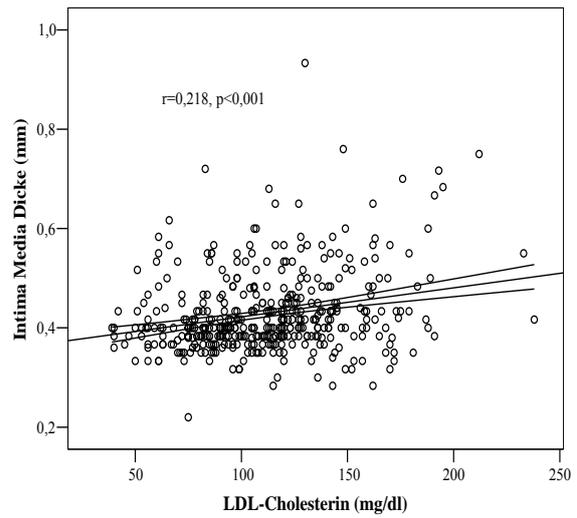


Abb. 12: Korrelation der IMT mit dem LDL-Cholesterin (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

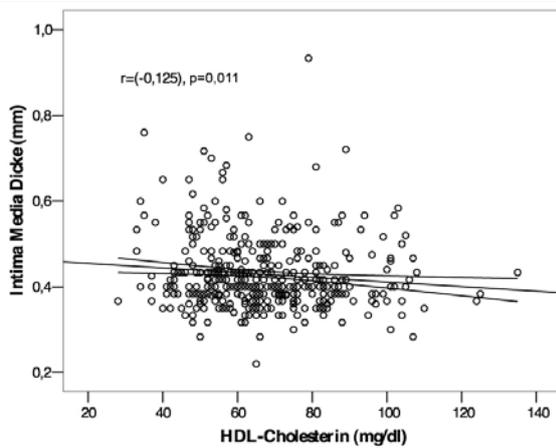


Abb. 13: Korrelation der IMT mit dem HDL-Cholesterin (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

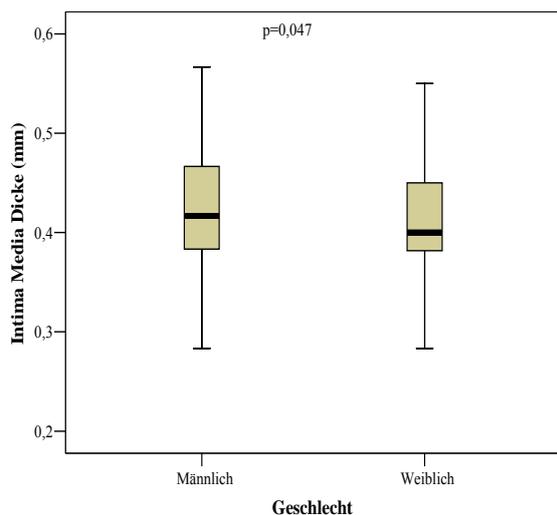


Abb. 14: Vergleich der IMT weiblicher und männlicher Studienteilnehmer (Mann-Whitney-Test; 2-seitig signifikant)

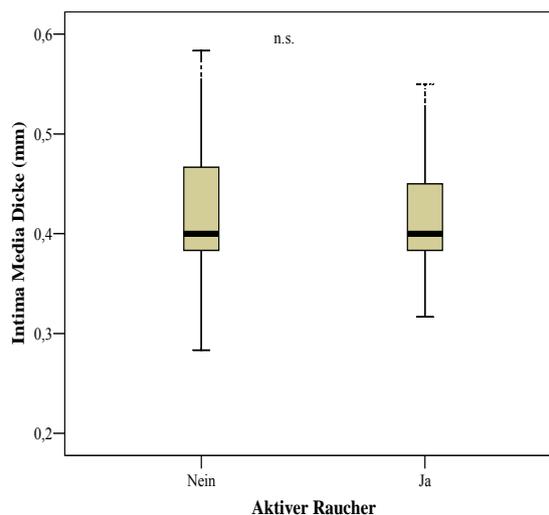


Abb. 15: Vergleich der IMT zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Mann-Whitney-Test, 2-seitig nicht signifikant)

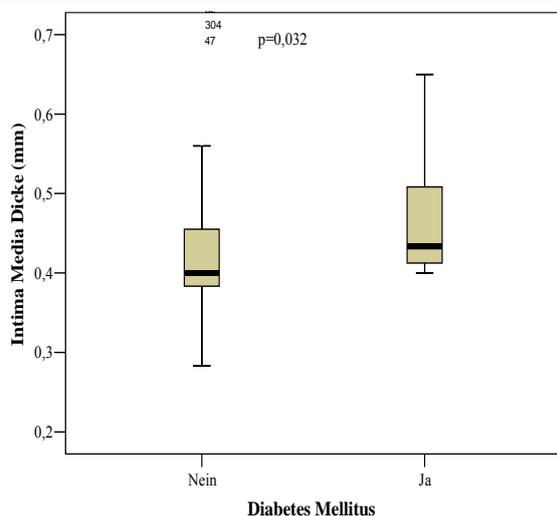


Abb. 16: Vergleich der IMT der Studienteilnehmer mit und ohne Diabetes mellitus (Mann-Whitney-Test; 2-seitig signifikant)

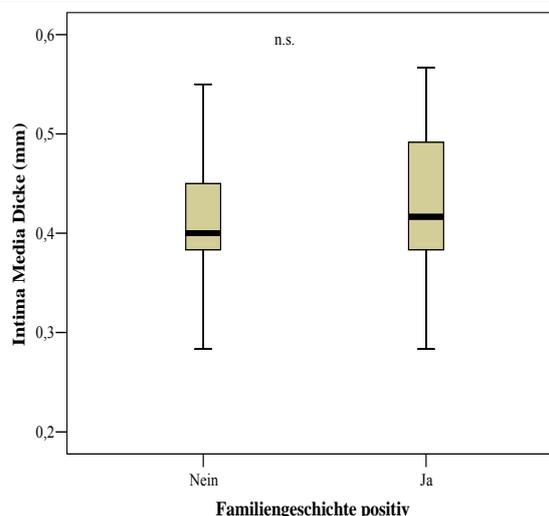


Abb. 17: Vergleich der IMT von Teilnehmern mit und ohne positiver Familienanamnese für kardio- und cerebrovaskuläre Ereignisse (Mann-Whitney-Test; 2-seitig nicht signifikant)

### 4.3 Assoziation der Intima Media Dicke mit Lymphozytenpopulationen

Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen der IMT als Marker subklinischer atherosklerotischer Gefäßveränderungen und den Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes. Berücksichtigt wurden hierbei die Gesamtlymphozyten, die Natürlichen Killerzellen, die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten, die CD4+ T-Lymphozyten sowie die CD8+ T-Lymphozyten. Bei den beiden Letztgenannten wurden zusätzlich die CD28- Subpopulationen bestimmt. Nicht bei allen 411 Studienteilnehmern liegt die Zahl aller Lymphozytenpopulation vor. Die Lymphozytenbestimmung war bei zwei

Probanden nicht möglich. Die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten konnten in fünf Fällen nicht bestimmt werden. Die Zellzahlen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten einschließlich der entsprechenden CD28<sup>-</sup> Subpopulationen und bei den Natürlichen Killerzellen lagen die Zellzahlen bei sechs Teilnehmern nicht vor.

Signifikante Korrelationen zwischen der IMT und den Gesamtl lymphozyten (Abb. 18), den T-Lymphozyten (Abb. 19), den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abb. 20), den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abb. 22), den CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Lymphozyten (Abb. 23) und den Natürlichen Killerzellen (Abb. 24) sind nicht nachweisbar (jeweils  $r < 0,1$ ). Das Signifikanzniveau erreichen formal die Assoziationen der IMT mit der Zellzahl der CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Lymphozyten ( $r = 0,109$ , Abb. 21) und mit der Zellzahl der B-Lymphozyten ( $r = 0,122$ , Abb. 25).

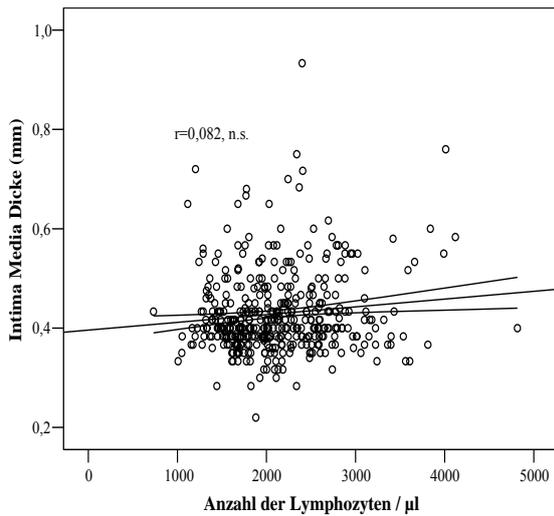


Abb. 18: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der Lymphozyten. (Spearman-Rho Rangkorrelation ; 2-seitig nicht signifikant)

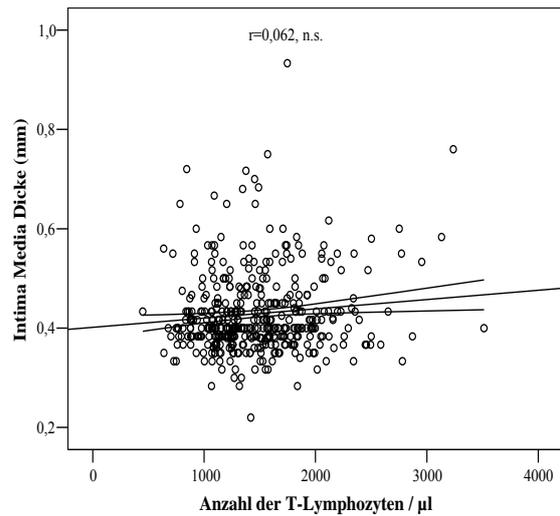


Abb. 19: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der T-Lymphozyten (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig nicht signifikant)

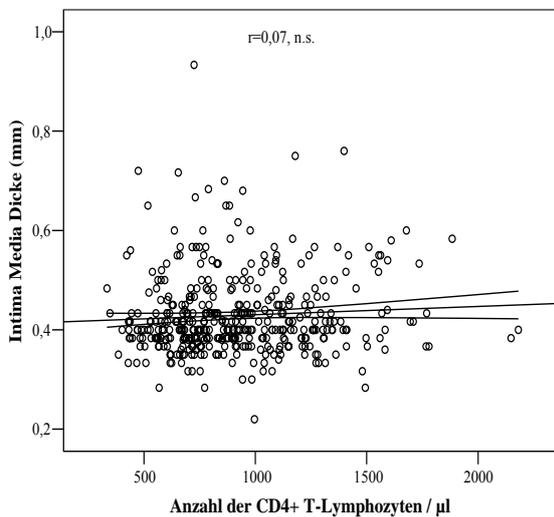


Abb. 20: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der CD4+ T-Lymphozyten (Spearman-Rho Korrelation, 2-seitig, nicht signifikant)

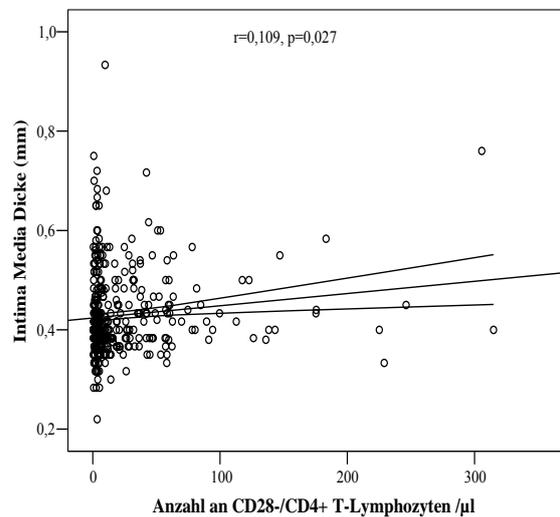


Abb. 21: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

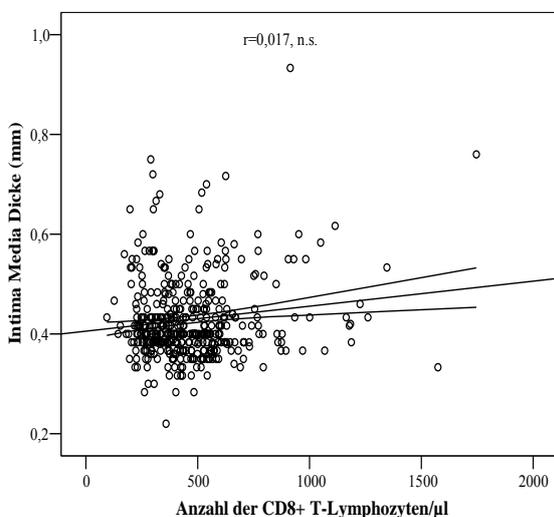


Abb. 22: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der CD8+ T-Lymphozyten (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig nicht signifikant)

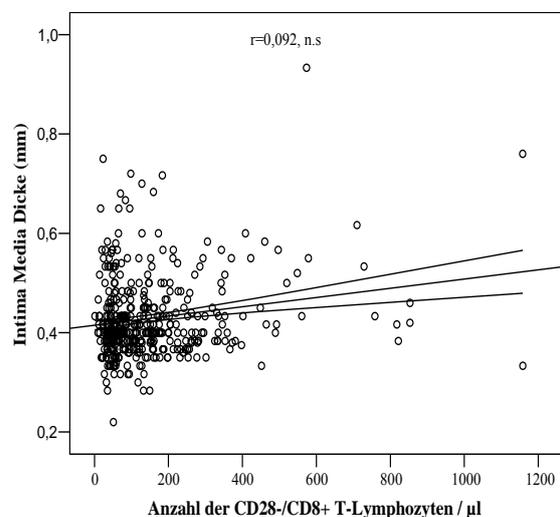


Abb. 23: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der CD8+CD28- T-Lymphozyten (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig nicht signifikant)

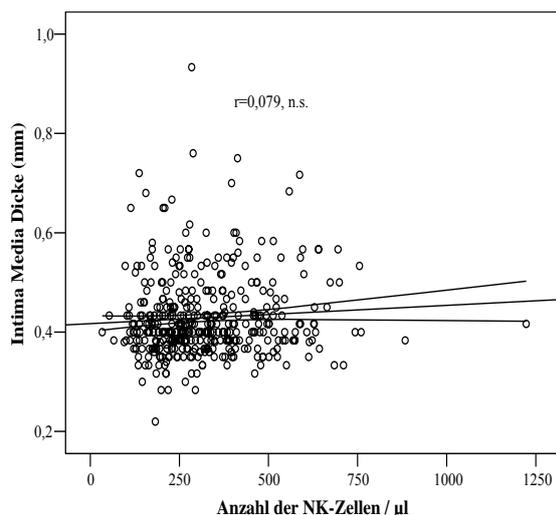


Abb. 24: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der Natürlichen Killerzellen (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig nicht signifikant)

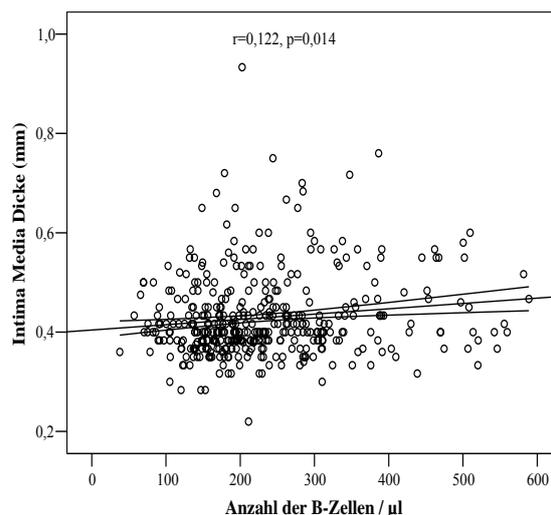


Abb. 25: Korrelation der IMT mit der Zellzahl der B-Lymphozyten (Spearman-Rho Rangkorrelation; 2-seitig signifikant)

#### 4.4 Assoziation der B-Lymphozyten und CD4+CD28- T-Lymphozyten mit atherosklerotischen Risikofaktoren

Die vorliegende Studie untersucht Assoziationen der IMT sowohl mit kardiovaskulären Risikofaktoren als auch mit Lymphozytensubpopulationen. Zusätzlich wurden Korrelationen zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und den einzelnen Lymphozytensubpopulationen untersucht. Diese Korrelationen sind jedoch nicht primärer Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Die folgende Darstellung berücksichtigt daher nur die Korrelationen der kardiovaskulären Risikofaktoren mit den beiden Zellpopulationen, für die sich signifikante Zusammenhänge mit der IMT ergeben (Tab. 9).

Für das Alter lässt sich eine signifikante positive Korrelation mit den CD4+CD28- T-Lymphozyten ( $r=0,248$ ) und mit den B-Lymphozyten ( $r=0,124$ ) nachweisen. Bei einzelnen anderen Risikofaktoren ergeben sich ebenfalls schwache, formal signifikante Zusammenhänge mit einer der beiden Zellpopulationen (Tab. 9 und 10).

Risikofaktor		B-Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)	CD4+CD28- T- Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)
Alter (Jahre)	r	0,124	0,248
	p	0,013	< 0,001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	r	0,151	0,042
	p	0,002	ns
Systolischer Blutdruck (mmHg)	r	0,039	0,097
	p	ns	Ns
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	r	0,008	0,031
	p	ns	ns
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	r	0,024	0,070
	p	ns	Ns
Pulsdruck (mmHg)	r	0,040	0,123
	p	Ns	0,013
Gesamtcholesterin (mg/dl)	r	0,096	0,122
	p	ns	0,014
LDL-Cholesterin (mg/dl)	r	0,120	0,073
	p	0,016	ns
HDL-Cholesterin (mg/dl)	r	-0,133	0,093
	p	0,007	Ns

Tab. 9: Korrelation der Zellzahl der B-Lymphozyten und der CD4+CD28- T-Lymphozyten mit atherosklerotischen Risikofaktoren (Spearman-Rho Rangkorrelation, 2-seitig signifikant)

Nominaler atherosklerotischer Risikofaktor	CD4+CD28- T-Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)	B-Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)
Raucher vs Nichtraucher p	19,6 vs 21,8 ns	268,9 vs 216,2 <0,001
Familäre vs keine familäre Belastung p	26,0 vs 20,2 ns	234,5 vs 231,9 ns
Diabetiker vs Nichtdiabetiker p	28,6 vs 21,0 ns	268,3 vs 231,3 ns
Männliche vs Weibliche Teilnehmer p	17,5 vs 23,1 <0,001	237,1 vs 229,8 ns

Tab. 10: Vergleich der Zellzahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten mit nominalen atherosklerotischen Risikofaktoren

#### **4.5 Assoziation der Intima Media Dicke mit B-Lymphozyten und CD4+CD28- T-Lymphozyten unter Berücksichtigung atherosklerotischer Risikofaktoren**

Neben einem Großteil der klassischen Risikofaktoren korrelieren in der vorliegenden Arbeit die B-Lymphozytenzahl und die Zahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten mit der IMT. Um die Unabhängigkeit dieser Assoziationen von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren zu überprüfen, wurden lineare Regressionsmodelle errechnet, die diese klassischen Risikofaktoren und die Anzahl der B-Lymphozyten respektive der CD4+C28- T-Lymphozyten als unabhängige und die IMT als abhängige Variablen berücksichtigen (Tabelle 11 und 12). Bei beiden Lymphozytenpopulationen ist der Zusammenhang zwischen den Zellzahlen und der IMT nach Korrektur für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren nicht mehr signifikant (siehe jeweils Modell 2). Bereits bei Einschluss des Alters der Studienteilnehmer (siehe jeweils Modell 1) besteht keine signifikante Assoziation der beiden Zellpopulationen mit der IMT mehr.

	Nicht standardisierter Koeffizient	Standardfehler	T-Wert	Signifikanz
<b>Modell 1</b>				
(Konstante)	0,221	0,018	12,144	<0,001
Alter (Jahre)	0,005	0,000	11,391	<0,001
B-Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)	6,26E-005	0,000	1,82	0,070
<b>Modell 2</b>				
(Konstante)	0,134	0,037	3,589	<0,001
Alter (Jahre)	0,004	0,000	8,775	<0,001
B-Lymphozyten (Zellzahl/ $\mu$ l)	5,74E-0005	0,000	1,641	0,102
Geschlecht (weiblich)	-0,013	0,008	- 1,609	0,108
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0,000	0,001	- 0,238	0,812
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	0,001	0,000	3,893	<0,001
Gesamtcholesterin (mg/dl)	0,000	0,000	1,371	0,171
HDL-Cholesterin (mg/dl)	0,000	0,000	- 1,431	0,153
Nikotin	-0,005	0,008	- 0,617	0,537

Tab. 11: Multiples Regressionsmodell der IMT unter Berücksichtigung der B-Lymphozyten  
abhängige Variable: IMT

aufgenommene Variablen im Modell 1:

Alter, Zellzahl B-Lymphozyten

aufgenommene Variablen im Modell 2:

Alter, B-Zellzahl, Geschlecht, BMI, Nikotin, mittlerer  
Blutdruck, HDL-Cholesterin, Gesamtcholesterin

	Nicht standardisierter Koeffizient	Standardfehler	T-Wert	Signifikanz
<b>Modell 1</b>				
Konstante	0,232	0,017	13,306	<0,001
Alter (Jahre)	0,005	0,000	11,280	<0,001
CD4+CD28- T- Lymphozyten	- 1,51E-005	0,000	-0,0164	0,870
<b>Modell 2</b>				
Konstante	0,14	0,038	3,724	<0,001
Alter (Jahre)	0,004	0,000	8,749	<0,001
CD4+ CD28- T- Lymphozyten	-3,64E-005	0,000	-0,406	0,685
Geschlecht (weiblich)	-0,013	0,008	-1,541	0,124
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	2,29E-005	0,001	0,023	0,981
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	0,001	0,000	3,802	<0,001
Gesamtcholesterin (mg/dl)	0,000	0,000	1,490	0,137
HDL-Cholesterin (mg/dl)	0,000	0,000	-1,59	0,113
Nikotin	-0,002	0,008	0,198	0,843

Tab. 12: Multiples Regressionsmodell der IMT unter Berücksichtigung der CD4+CD28- T-Lymphozyten  
Abhängige Variable: IMT

Aufgenommene Variablen Modell 1:

Alter, Zellzahl CD4+CD28- T-Lymphozyten

Aufgenommene Variablen Modell 2:

Alter, Zellzahl CD4+CD28- T-Lymphozyten,  
Geschlecht, BMI, Mittlerer Blutdruck, Gesamtcholesterin, HDL-  
Cholesterin, Nikotin

---

## 5 Diskussion

---

In einer Querschnittsstudie wurde bei 411 gesunden Probanden die Assoziation der mittleren IMT der Arteria Carotis Communis mit allgemein anerkannten atherosklerotischen Risikofaktoren und mit Lymphozytensubpopulationen untersucht. Dabei fanden sich für zwei Zellpopulationen, die CD4+CD28- T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten schwach positive, aber signifikante Zusammenhänge.

Das untersuchte Kollektiv weist, verglichen mit der Durchschnittsbevölkerung, ein niedriges atherosklerotisches Risiko auf. Nicht eingeschlossen wurden Probanden mit bekannten oder anamnestischen Hinweisen auf kardio- und cerebrovaskuläre Ereignisse. Die Mehrheit der Studienteilnehmer ist weiblich (66 %), das Durchschnittsalter ist niedrig ( $42,4 \pm 8,9$  Jahre), der mittlere systolische und der diastolische Blutdruck ist normotensiv und das mittlere Gesamtcholesterin liegt im Normalbereich. Nur ein geringer Anteil der Probanden wurde mit Antihypertensiva (10,2 %) und/oder mit Cholesterinsenkern (0,5 %) behandelt. Bei wenigen Probanden lag ein bekannter Diabetes mellitus (2,7 %) vor, ein Teil war zum Zeitpunkt der Teilnahme Raucher (30,4 %).

### 5.1 Intima Media Dicke und atherosklerotische Risikofaktoren

Die mittlere IMT wurde mit atherosklerotischen Risikofaktoren korreliert. Dabei fanden sich signifikante Zusammenhänge für einen Großteil allgemein akzeptierter atherosklerotischer Risikofaktoren: Alter, BMI, systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck sowie Pulsdruck, Gesamt-, LDL- und (invers) HDL-Cholesterin, Diabetes mellitus und Geschlecht. Signifikante Korrelationen zwischen der IMT und den Risikofaktoren wurden in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen und stützen die Validität der vorliegenden Untersuchung (Stensland-Bugge et al., 2000; Howard et al., 1993; Garipey et al., 1998; Ferrières et al., 1999; de Michele et al., 2002; Garipey et al., 1993; Howard et al., 1991; Saba et al., 1999; Oren et al., 2003; Zureik et al., 1999; Heiss et al., 1991; Hanefeld et al., 1999; Mykkänen et al., 1997; Salonen et al., 1991; Bolinder et al. 1997). Da ebenfalls eine Studienpopulation mit niedrigem atherosklerotischen Risiko untersucht wurde (N=1031, 536 Männer,  $49,6 \pm 8,6$  Jahre; 477 Frauen,  $49,7 \pm 8,5$ ), lassen die Ergebnisse von Ferrières (Ferrières et al., 1999) mit Einschränkungen eine Vergleichbarkeit zu. Wie in der vorliegenden Untersuchung bestehen

die größten Korrelationskoeffizienten in dieser Studie für das Alter (Männer  $r=0,50$ , Frauen  $r=0,48$ ) und für den systolischen Blutdruck (Männer  $r=0,38$ , Frauen  $r=0,32$ ), während die anderen Risikofaktoren niedrigere Korrelationskoeffizienten aufweisen.

Im Widerspruch zu anderen Untersuchungen steht, dass in der vorliegenden Studie Raucher keine höhere IMT aufweisen als Nichtraucher. Beide Gruppen sind etwa gleich alt ( $42,6\pm 8,7$  Jahre vs  $42,3\pm 9,0$  Jahre; ns). Mehrere Studien fanden bei Rauchern signifikant höhere IMT-Werte als bei Nichtrauchern (Howard et al., 1994, Garipey et al., 2000; Simon et al., 2002). Allerdings haben andere Studien gerade bei Frauen ebenfalls keine Verbindung von erhöhten IMT-Werten mit dem Rauchen gezeigt. In der vorliegenden Untersuchung ist der Frauenanteil hoch. Beispielsweise untersuchten Stensland-Bugge et al. (2000) bei 3128 Erwachsenen mittleren Alters den Zusammenhang der IMT zu 15 Jahren zuvor erfassten atherosklerotischen Risikofaktoren. Während bei den Männern ein Zusammenhang zwischen dem Rauchen und erhöhter IMT bestand, konnte dies bei den Frauen nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen (Garipey et al., 2000; Ferrières et al., 1999) fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der IMT bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen, während dieser bei männlichen Teilnehmern vorlag. Ursache des fehlenden Zusammenhangs in der vorliegenden Untersuchung dürfte unter anderem die geringe Expositionsdauer ( $14,3\pm 11,6$  PY) sein. Da die IMT die Belastung mit Risikofaktoren über einen Zeitraum widerspiegelt (Grobbee et al., 1994; Simon et al., 2002), wird das Rauchen erst über längere Zeit zu relativ erhöhten IMT Werten führen. In der vorliegenden Untersuchung ist die Dauer des Nikotinkonsums dafür möglicherweise zu gering. Des Weiteren befinden sich in der Gruppe der „nicht-aktiven Raucher“ sowohl „ehemalige Raucher“ als auch „Nie-Raucher“. Dadurch dürfte der Unterschied der IMT zu der Gruppe der aktiven Raucher ebenfalls geringer ausfallen.

Genetische Faktoren beeinflussen ebenfalls die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen. In diesem Zusammenhang sind bei Probanden mit familiärer Belastung erhöhte IMT-Werte gefunden worden (Juonala et al., 2006; Wang et al., 2003; Fox et al., 2003). Als ein solches familiäres Risiko galt in der vorliegenden Studie ein Herzinfarkt oder Schlaganfall der Eltern oder Geschwister vor dem 60. Lebensjahr. Ein Zusammenhang zwischen der familiären Belastung und der IMT konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist dies eventuell auf das niedrige Durchschnittsalter der Studienteilnehmer, so dass entsprechende Ereignisse bei Eltern und Geschwistern noch nicht eingetreten sind.

Möglicherweise ist die Studienpopulation für die Beantwortung einer solchen Fragestellung nicht groß genug.

Bei insgesamt 408 Studienteilnehmern wurde das C-reaktive Protein (CRP) als Marker der sogenannten Mikroinflammation bestimmt. Jedoch waren die Bestimmungen nur bei einem Teil der Teilnehmer sinnvoll verwertbar, da bei der Labordiagnostik der ersten 204 Probanden ein unterer Grenzwert von 3 mg/l bestand, so dass geringgradig erhöhte CRP Werte entsprechend einer Mikroinflammation (etwa 0,5-3 mg/l) nicht erkannt werden. Bei weiteren 161 Probanden erfolgte die Angabe des CRP ab einem unteren Grenzwert von 0,6 mg/l, bei 43 Probanden wurde das hs-CRP mit einem unteren Grenzwert von 0,1 mg/l bestimmt. Eine signifikante Korrelation mit der IMT bestand in keiner der Gruppen. Das C-reaktive Protein ist ausführlich untersucht und galt als vielversprechender Marker zur Erkennung von Risikopatienten in der Primär- und Sekundärprävention. Vorteil der Erfassung dieser humoralen Komponente des Immunsystems ist die einfache Bestimmung, die im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen aus Analysen eingefrorener Proben noch Jahre nach der Probengewinnung möglich ist.

Nachdem anfänglich große epidemiologische Arbeiten erhöhte CRP Werte als wichtige Prädiktoren zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse propagierten (Ridker, 1999), stufen nachfolgende epidemiologische Arbeiten den Zusammenhang von CRP und der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse nur als moderat ein (Danesh et al., 2004) und kommen zu dem Schluss, dass die Erfassung des CRP und ähnlicher humoraler Marker nur einen sehr geringen Informationsgewinn mit sich bringt (Wang et al., 2006). Aktuelle Studien konnten zwar eine univariate Assoziation zwischen dem hs-CRP und der IMT nachweisen (Makita et al., 2005; Lorenz et al., 2006), unter Berücksichtigung anderer Risikofaktoren waren diese aber nicht mehr vorhanden. Darüber hinaus ist die pathogenetische Relevanz des C-reaktiven Proteins in der Atherogenese nicht sicher geklärt (Yeh, 2005; Pepys et al., 2003).

## **5.2 Intima Media Dicke und Lymphozytensubpopulationen**

In der vorliegenden Querschnittsstudie wurde in einem großen Kollektiv mit einem niedrigen atherosklerotischen Risiko die Assoziation zwischen der IMT und Lymphozytensubpopulationen untersucht. Deren Beteiligung an der Atherogenese ist belegt

(Hansson, 2005; Hansson et al., 2006). Vergleichbare Untersuchungen für Lymphozytensubpopulationen sind bisher nicht an einem solchen Kollektiv durchgeführt worden, für die Gesamtzahl der peripheren Leukozyten ist jedoch ein positiver Zusammenhang mit erhöhten IMT-Werten beschrieben (Loimaala et al., 2006). In der vorliegenden Untersuchung bestehen schwache, aber signifikante Korrelationen für die B-Lymphozyten und die CD4+CD28- T-Lymphozyten. Unter Berücksichtigung klassischer atherosklerotischer Risikofaktoren ist in multiplen Regressionsmodellen eine signifikante Assoziation der beiden Subpopulationen mit der IMT nicht nachweisbar.

### **5.2.1 Intima Media Dicke und Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen sind in allen Stadien atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen nachgewiesen worden. Sie befinden sich in sehr kleiner Zahl vornehmlich im Randbereich früher atherosklerotischer Läsionen (Millonig et al., 2002). In einer kleinen Studie fanden sich bei älteren Menschen mit einem erniedrigten Knöchel-Arm-Index als Marker einer generalisierten Atherosklerose erhöhte NK-Zellzahlen im peripheren Blut (Bruunsgard et al., 2001); die Autoren interpretieren diesen Umstand als Nachweis eines allgemein erhöhten Entzündungsniveaus. Eine andere Untersuchung (Clerc et al., 1997) mit einer kleinen Fallzahl (N=29) fand bei manifester Atherosklerose, definiert als eine nachgewiesene KHK oder pAVK, ebenfalls höhere NK-Zellzahlen als bei Kontrollen ohne nachgewiesene oder ohne klinische Atherosklerose. Dazu passend wiesen Whitmann (Whitmann et al., 2004) und Ramsamy (Ramsamy et al., 2005) in Mausmodellen bei abgeschwächter NK-Zell-Funktion verminderte atherosklerotische Gefäßveränderungen nach.

Eine signifikante Korrelation der NK-Zellen mit der IMT konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Zusammenhänge zwischen den Natürlichen Killerzellen und der IMT als Atherosklerosemarker sind bisher nicht bei einem Kollektiv mit einem niedrigen atherosklerotischen Risiko untersucht worden. Tanigawa und Mitarbeiter (2003) fanden bei einem deutlich älteren und nur aus männlichen Teilnehmern bestehenden Kollektiv bei Rauchern in einem univariaten Modell einen negativen Zusammenhang zwischen diesen Größen. Unter Berücksichtigung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren war dieser Zusammenhang in der multivariaten Analyse nicht signifikant. Diese negative Assoziation steht nicht mit den Daten aus den erwähnten Tierexperimenten im Einklang.

Die erwähnten Studien weisen bei deutlichen methodischen Limitationen auf eine Veränderung der NK-Zellzahl im peripheren Blut im Rahmen klinisch manifester Atherosklerose hin, während dies aufgrund der vorliegenden Daten in präklinischen Stadien nicht angenommen werden kann. Möglicherweise begünstigt eine Erhöhung der NK-Zellen das Auftreten klinischer Stadien bei fortgeschrittener Atherosklerose oder ist Folge einer solchen. Insgesamt ist die Rolle der NK-Zellen in der Atherogenese unzureichend untersucht und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### **5.2.2 Intima Media Dicke und B-Lymphozyten**

In Plaques sind B-Lymphozyten nachgewiesen worden (Jonasson et al., 1986). Sie befinden sich auch in der Adventitia. Es wird angenommen, dass sie von dort aus den Entzündungsprozess beeinflussen (Ramshaw et al., 1990). Im Tiermodell an Mäusen führen die Beeinflussung der B-Zellen mit konsekutiver Zellzahlverminderung (Major et al., 2002) oder durch genetische Schädigung (Caligiuri et al., 2002) zu einer vermehrten Atheroskleroseentstehung. Dabei muss eine atheroprotektive Wirkung durch die Produktion spezifischer Antikörper oder durch Immunmodulation angenommen werden. Auch scheint bei Menschen nach Splenektomie mit nachfolgender Störung der B-Lymphozyten das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht (Hansson, 2005), so dass B-Lymphozyten insgesamt eine atheroprotektive Wirkung zugesprochen wird.

In einer Arbeit von Tanigawa (Tanigawa et al., 2003) konnte keine Beziehung zwischen der IMT und der Gesamtzahl der B-Zellen des peripheren Blutes unter Berücksichtigung atherosklerotischer Risikofaktoren nachgewiesen werden. Für die Untergruppe der CD 80 exprimierenden B-Lymphozyten bestand jedoch eine signifikant positive Korrelation. Das Teilnehmerkollektiv ist allerdings bezüglich des höheren atherosklerotischen Risikoprofils mit dem der vorliegenden Studie nicht vergleichbar.

In der vorliegenden Untersuchung liegt eine signifikant positive Korrelation der IMT mit der Anzahl der peripheren B-Lymphozyten vor. Der Korrelationskoeffizient ist im Vergleich zu den klassischen Risikofaktoren kleiner ( $r=0,122$ ). In der multiplen Regressionsanalyse lag die Assoziation außerhalb des Signifikanzniveaus, so dass kein unabhängiger Zusammenhang nachweisbar ist.

Die aufgeführten Untersuchungen zur Rolle der B-Lymphozyten in der Atherosklerose sind somit uneinheitlich: Tiermodelle weisen auf eine atheroprotektive Wirkung hin, während periphere B-Lymphozytenpopulationen bei Menschen mit erhöhten IMT Werten assoziiert sind. Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der peripheren B-Zellen bei erhöhter IMT könnte sein, dass diese Ausdruck eines allgemeinen Entzündungsgeschehens ist. Diese Vermutung wird unterstützt von der Beobachtung, dass die CD 80 exprimierenden B-Lymphozyten, die von Tanigawa (Tanigawa et al., 2003) mit der IMT in Zusammenhang gebracht werden konnten, als Marker chronischer Entzündungen gelten. Beispielsweise weisen B-Lymphozyten aus älteren atheroskleroseempfindlichen Mäusen höhere Expressionen dieses co-stimulatorischen Moleküls auf als die vergleichbarer jüngerer Mäuse (Afek et al., 2004). Während die CD80 positiven B-Lymphozyten also einen chronischen Entzündungsprozess widerspiegeln, könnten lokale B-Lymphozyten inhibitorisch auf den Entzündungsprozess wirken. Letzteres wäre über die Sekretion von IL-10 denkbar, einem antiatherosklerotischen Zytokin (Lund et al., 2005). Denkbar ist auch eine spezifische Immunität, welche gegen die Atherosklerose triggernde Antigene gerichtet ist und so einen atheroprotektiven Effekt (Hansson, 2002) hat. B-Lymphozyten der vorliegenden Untersuchung sind nicht weiter subspezifiziert worden. In der zukünftigen Forschung sollte die funktionelle und immunphänotypische Heterogenität der B-Lymphozyten berücksichtigt werden.

### **5.2.3 Intima Media Dicke und T-Lymphozytensubpopulationen**

T-Lymphozyten, welche anhand von Oberflächenmerkmalen weiter unterteilt werden können, wurden auf einen Zusammenhang mit der IMT als Marker für das Ausmaß atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen hin untersucht. Für die Zahl der Gesamtlymphozyten, der T-Lymphozyten, der CD8+ T-Lymphozyten, der CD8+CD28- T-Lymphozyten und der CD4+ T-Lymphozyten konnte keine signifikante Korrelation mit subklinischer Atherosklerose nachgewiesen werden.

Nur wenige Untersuchungen haben sich bisher mit diesem Zusammenhang beschäftigt. Dazu gehört die bereits zitierte Studie von Tanigawa (Tanigawa et al., 2003) an 557 Männern zwischen 61 und 74 Jahren ohne ausgeprägtes atherosklerotisches Risikoprofil. Hier wurde ebenfalls eine Assoziation zwischen der IMT und den T-Lymphozytensubpopulationen vermutet. In der genannten Untersuchung korrelierte weder deren Gesamtzahl noch die der

CD4+ und der CD8+ Lymphozyten unter Berücksichtigung kardiovaskulärer Risikofaktoren signifikant mit der IMT.

CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sind in atherosklerotischen Gefäßläsionen beschrieben (Frostegard et al., 1999) worden, im Plaque ist ihr Verhältnis im Allgemeinen ähnlich wie im peripheren Blut (Jonasson et al., 1986). Über die Funktion der CD8+ T-Zellen im Rahmen der Atherogenese ist wenig bekannt. Eine Erhöhung im peripheren Blut bei koronarangiographisch nachgewiesener KHK ist in Verbindung mit einer CMV-Infektion beschrieben, scheint davon aber auch unabhängig zu bestehen (Jonasson et al., 2003). Bei Mäusen verändert ein Fehlen der CD8+ Lymphozyten nicht das histologische Bild (Elhage et al., 2004) im Vergleich zu Kontrollen; andererseits konnte eine proatherogene Wirkung bei entsprechend stimulierten Zellen festgestellt werden (Ludewig et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen nicht auf eine Bedeutung der CD8+ T-Lymphozyten in der frühen Atherogenese hin.

Zwischen der IMT und den CD8+CD28- T-Lymphozyten fand sich ebenfalls keine Assoziation. Auffällig ist, dass die Anzahl der CD28- Zellen durchschnittlich um fast das Vierfache höher ist als die der CD4+CD28- Zellen. Die Ursache hierfür ist unklar. Möglicherweise verlieren die CD8+ Zellen das CD28 Molekül früher als die CD4+ T-Lymphozyten. Bei dem CD28 Molekül handelt sich um ein co-stimulatorisches Molekül der Zellaktivierung, welches im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse eine Rolle spielt. Allgemein wird angenommen, dass das Fehlen dieses Oberflächenproteins Ausdruck einer Zellalterung ist (Vallejo et al., 2004).

#### **5.2.4 Intima Media Dicke und CD4+ T-Lymphozyten**

Im vorliegenden Studienkollektiv korreliert die IMT nicht signifikant mit den CD4+ T-Lymphozyten. In der erwähnten Studie von Tanigawa (Tanigawa et al., 2003) ergab sich unter Berücksichtigung anderer Risikofaktoren ebenfalls keine signifikante Korrelation der IMT mit dieser Lymphozytenpopulation. Nachweisbar war dies jedoch für die Untergruppe der CD45RO+CD4+ T-Lymphozyten, die als Gedächtniszellen bezeichnet werden. In einer weitaus kleineren Studie an Patienten mit primärem Anti Phospholipid Syndrom ist die Assoziation mit CD45RO+CD4+ T-Lymphozyten ebenfalls nachgewiesen worden (Ames et al., 2005).

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose (Robertson et al., 2006). Sie sind in frühen Stadien sowohl im Tiermodell (Song et al., 2001) als auch bei Menschen (Stary et al., 1994) in histologischen Untersuchungen nachgewiesen. Auch im späteren Krankheitsverlauf, der atherosklerotischen Plaque, sind diese nachzuweisen (Stemme et al., 1992). Vor allem CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten scheinen beteiligt (Roselaar et al., 1996). Sie sind in größerer Anzahl im menschlichen Plaque zu finden als CD8<sup>+</sup> Zellen (Frostedgård et al., 1999). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der Atherosklerose durch Abschwächung oder Ausschaltung des adaptiven Immunsystems unterdrückt wird (Hansson, 2005). Verschiedene Tierexperimente heben ebenfalls die Bedeutung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten hervor. Zhou (Zhou et al., 2000) verstärkte durch den Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in immundefiziente Mäuse die pathologischen Gefäßveränderungen. Gleichzeitig führt die Gabe von anti-CD4-AK im Modell zu einer Abnahme der „Fatty Streaks“ (Huber et al., 2001).

Des Weiteren lassen sich erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten des peripheren Blutes bei symptomatischen Stadien der Atherosklerose beim Menschen nachweisen. Dies gilt beispielsweise für stabile und instabile Angina Pectoris (Jonasson et al., 2002; Neri Serneri et al., 1997). De Palma et al. (2006) zeigten, dass die Instabilität von Plaques im Rahmen des ACS von klonaler T-Zell-Aktivierung begleitet ist. Diese ist allerdings auf die Gefäßwand beschränkt und wird nicht von entsprechender klonaler Expansion im peripheren Blut begleitet.

Periphere CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind bei asymptomatischen oder sehr frühen Stadien der Atherogenese bisher unzureichend untersucht. Die vorliegende Arbeit konnte eine Erhöhung von CD4<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut bei einer subklinischen Population mit niedrigem Risiko nicht mit einer Erhöhung der IMT als Surrogatmarker atherosklerotischer Gefäßveränderungen in Verbindung bringen. Die fehlende Korrelation kann verschiedene Ursachen haben: Hervorzuheben ist, dass es sich bei der Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten keineswegs um eine einheitliche Zellpopulation handelt (Amyes et al., 2005), auch wenn ihr insgesamt ein proatherosklerotisches Potential zugeschrieben wird (Robertson et al., 2006).

Die Subpopulationen der T-Lymphozyten können in Bezug auf den pathologischen Prozess unterschiedliche Wirkungen haben. Beispielsweise gelten die CD4<sup>+</sup> Regulatorischen T-Zellen

insgesamt als antiatherosklerotisch, während dies für CD4+CD28- T-Lymphozyten nicht angenommen wird (Robertson et al., 2006). In der erwähnten Studie von Tanigawa (Tanigawa et al., 2003) fand sich die signifikante Korrelation für eine CD4+CD45RO+ T-Subpopulation, die unter den T-Lymphozyten im Plaque die Mehrheit bilden (Stemme et al., 1992). Unterschiedliche Rollen verschiedener Subpopulationen auf den atherosklerotischen Prozess könnten die fehlende Assoziation mit der IMT in der vorliegenden Untersuchung erklären.

### **5.2.5 Intima Media Dicke und CD4+CD28- T-Lymphozyten**

Im peripheren Blut sind nur sehr wenige der CD4+ T-Lymphozyten negativ für das Oberflächenmerkmal CD28, deren Anzahl nimmt aber im Alter zu (Vallejo et al., 1998). Es wird angenommen, dass der Verlust von CD28 Folge einer andauernden Zellaktivierung ist (Warrington et al., 2003) und somit Ausdruck einer Zellalterung sein könnte. Diese Subpopulation besitzt ein proinflammatorisches Potential und bildet verschiedene Zytokine in großen Mengen (Park et al., 1997; Liuzzo et al., 1999; Thompson et al., 1989) wie beispielsweise das IFN $\gamma$ , ein Zytokin, dessen Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose sehr komplex, insgesamt aber proatherosklerotisch ist (Robertson et al., 2006; Hansson, 2005). In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich, dass CD4+CD28- T-Lymphozyten mit der IMT univariat korrelieren ( $r=0,109$ ). Im multiplen Regressionsmodell ist dieser Zusammenhang nicht mehr signifikant unabhängig von klassischen Risikofaktoren.

Die Atheroskleroseforschung hat sich bereits intensiver mit CD4+CD28- Lymphozyten beschäftigt. Insbesondere mit atherosklerotisch bedingten Komplikationen konnten sie in Verbindung gebracht werden. Im peripheren Blut sind sie bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris etwa neunfach höher als bei solchen mit stabiler Angina (Liuzzo et al., 1999). Bei letzteren ließ sich keine Erhöhung nachweisen. Es bleibt aber offen, ob diese Erhöhung Ursache oder Folge einer Plaqueinstabilität ist (Liuzzo et al., 2000). Auch lässt sich diese Zellgruppe mit einem erhöhten Risiko eines zukünftigen ACS bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris in Verbindung bringen (Liuzzo et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD4+CD28- T-Lymphozyten, die beim ACS erhöht sind, auf Antigene reagieren, die in Plaques nachweisbar sind (Zal et al., 2004; Zal et al., 2007). Dies deutet auf eine entscheidende Rolle dieser Zellen beim ACS hin. Die Vermutung der Beteiligung am ACS basiert auf der Fähigkeit dieser Zellen, Endothelzellen zu lysieren, wobei möglicherweise Perforine beteiligt sind (Nakajima et al., 2002). In menschlichen Plaques

scheinen nur wenige T-Lymphozyten Zellen CD28 zu exprimieren (de Boer et al., 1997). Kürzlich konnte eine oligoklonale Vermehrung von T-Zellen in Plaques nachgewiesen werden (de Palma et al., 2006). In dieser Veröffentlichung fanden sich allerdings keine Angaben darüber, ob diese T-Zellen CD28 negativ waren. Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen die These, dass CD4+CD28- T-Zellen im Rahmen der Instabilität von Gefäßläsionen eine Rolle spielen (Nakjima et al., 2002). Nadareishvili et al. (2004) brachten diese Zellen mit schwerwiegenderen Folgen eines Schlaganfalls in Verbindung. Sowohl bei Nadareishvili et al. (2004) als auch bei Liuzzo et al. (1999) war die Erhöhung der CD4+CD28- T-Zellen nicht nur auf das akute Ereignis beschränkt, sondern überdauerte dies zeitlich. Es ist sowohl eine antigenspezifische als auch eine antigenunabhängige Rekrutierung von CD4+CD28- T-Lymphozyten im Rahmen der Atherogenese und ihrer Komplikationen denkbar (Robertson et al., 2007).

Bisher haben sich sehr wenige Untersuchungen mit der Rolle der CD4+CD28- T-Lymphozyten in früheren Stadien der Atherosklerose beschäftigt. Neben der vorliegenden Studie finden sich bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis Hinweise auf eine Beteiligung dieser Zellen in der frühen Atherosklerose. Bei Teilnehmern mit Rheumatoider Arthritis ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen fanden sich höhere IMT-Werte bei Patienten mit erhöhter Zahl an CD4+CD28- T-Lymphozyten im peripheren Blut als bei denen ohne diese Zellgruppe (Gerli et al., 2004). Daher kann eine Beteiligung dieser Zellen an frühen Stadien vermutet werden. Es ist bekannt, dass TNF $\alpha$  die CD28 Expression auf Zellen herunter regulieren kann (Bryl et al., 2001). Eine Inhibition von TNF $\alpha$  durch den monoklonalen Antikörper Infliximab ex vivo führt zu einer Zunahme dieses Oberflächenmarkers auf Zellen (Rizzello et al., 2006). Auch Gerli et al. (2004) wies unter TNF $\alpha$ -Blockade einen Anstieg der CD28 Expression auf den CD4+ T-Lymphozyten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nach. Neben Gerli (Gerli et al., 2004) beschrieb Del Porto (del Porto et al., 2007) eine Abnahme der IMT unter Therapie mit TNF $\alpha$  Blockern; eine kausale Beziehung zwischen einer erhöhten IMT und den CD28- Zellen ist somit denkbar. Da das Risiko einer KHK bei Rheumatoider Arthritis erhöht ist, können diese Untersuchungen nicht ohne weiteres auf die Population der vorliegenden Studie übertragen werden. Insgesamt ist die vorliegende Untersuchung die bisher einzige zu CD4+CD28- T-Lymphozyten des peripheren Blutes bei Probanden mit niedrigem kardiovaskulären Risiko und ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen. Es ergeben sich dabei Hinweise auf eine Assoziation zu frühen Stadien der Atherosklerose, ohne dass diese unabhängig von klassischen atherosklerotischen Risikofaktoren sind.

### 5.3 Einschränkungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterliegen gewissen Einschränkungen. Da es sich um eine Querschnittsstudie handelt, ergibt sich keine Aussage über den Langzeitverlauf. Auch lassen sich die Ergebnisse letztlich nur auf ein Kollektiv mit niedrigem atherosklerotischen Risiko übertragen. Die Daten wurden nur ein einziges Mal erhoben. Dadurch besteht insbesondere für die Charakterisierung der Zusammensetzung der Leukozyten des peripheren Blutes, die verschiedenen Einflüssen unterliegen, die Gefahr eingeschränkter Reliabilität. Hierbei spielen auch kurzfristige Effekte eine Rolle wie beispielsweise das Rauchen, welches das Verhältnis der zellulären Bestandteile des Blutes verändert (Freedman et al., 1996). Schließlich erschwert die geringe Anzahl bestimmter Zelltypen im Blut, beispielsweise die der CD4+CD28- T-Lymphozyten, deren exakte Bestimmung. Die Zahl dieser Zellen lag in den meisten Fällen unter 50 Zellen/ $\mu$ l.

Einschränkungen bestehen weiterhin bezüglich der Ultraschalluntersuchung. Die eingeschränkte Reliabilität der Bestimmung der IMT via Ultraschall ist als Fehlerquelle beschrieben (Kanters et al., 1997). Die IMT wurde ausschließlich an der ACC ermittelt, auf eine Berücksichtigung des Herzzyklus wurde verzichtet. Auch ist wiederholt kritisiert worden, dass die IMT nicht die Intima alleine darstellt, obwohl die atherosklerotischen Veränderungen insbesondere in frühen Stadien hauptsächlich diese Wandschicht betreffen. Insbesondere bei leicht erhöhten IMT-Werten besteht die Gefahr, dass sie nicht atherosklerotisch bedingt sind (Grobbee et al., 1994). Beispielsweise führt die Fibromuskuläre Dysplasie (Glagov et al., 1988) oder hämodynamischer Stress (Glagov et al., 1992) zu erhöhten IMT Werten, ohne dass atherosklerotische Veränderungen vorliegen.

Eine Zunahme der IMT ist nicht in jedem Fall pathologisch, da unabhängig von anderen Risikofaktoren mit dem Alter der Durchmesser der inneren Gefäßwandschichten ansteigt. Aus diesem Grund hat man versucht, Normwerte festzulegen. Diese haben sich bisher allerdings nicht durchgesetzt (Howard et al., 1993; Simon et al., 2002). Simon et al. (2002) haben vorgeschlagen, den IMT-Wert im Gesamtkontext des atherosklerotischen Risikoprofils zu betrachten und nicht als Größe innerhalb der statistischen Verteilung in einer gesunden Population.

Die Verwendung der sonographisch erfassten IMT der Karotiden als Surrogatmarker für Atherosklerose lässt sich rechtfertigen. Histologische Untersuchungen haben die Assoziation von Risikofaktoren mit der IMT als Marker atherosklerotischer Veränderungen nachgewiesen. Auch treten in den Karotiden fortgeschrittene Veränderungen im Allgemeinen relativ spät im Vergleich zu anderen Abschnitten des arteriellen Gefäßsystems auf (Solberg et al., 1971; Dalager et al., 2007), so dass bereits leicht erhöhte IMT-Werte Ausdruck einer systemischen Atherosklerose sein können (Grobbe et al., 1994). Die Beschränkung der vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung der IMT an plaquefreien Abschnitten des Gefäßes ist ebenfalls gerechtfertigt (Lorenz et al., Circulation 2007 a; Lorenz et al., 2007 b). Während Plaques womöglich eher ein lokales Risiko darstellen, spiegelt die IMT das generelle Ausmaß der atherosklerotischen Gefäßveränderungen wider (Grobbee et al., 1994; Lorenz et al., 2007 a; Lorenz et al., 2007 b). Des Weiteren spricht für die Bestimmung der IMT, dass die Verbreiterung des Intima-Media Komplexes aufgrund der Häufigkeit der Atherosklerose großteils auf dieses Krankheitsbild zurückzuführen ist.

Auf Grundlage dieser Studie können keine Aussagen über die unmittelbare Beteiligung der untersuchten Zellpopulationen in der Atherogenese getroffen werden. Veränderungen der Zahl verschiedener Zelltypen müssen nicht in kausalem Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen stehen, sondern können auch reaktiv als Folge des Inflammationsprozesses auftreten. Dennoch können sich Anhaltspunkte für die Rolle der zirkulierenden Lymphozyten in der Atherogenese ergeben. Durch die hohe Teilnehmerzahl kann trotz verzerrender Faktoren eine Aussage getroffen werden.

## 5.4 Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ergeben sich weitere Fragestellungen. Diese betreffen vor allem die CD4+CD28- T-Lymphozyten. In Langzeitstudien wäre zu ermitteln, ob eine Erhöhung dieser Zellzahl bereits in asymptomatischen Stadien der Atherosklerose mit zukünftigen vaskulären Ereignissen assoziiert ist. Es ist nicht klar, ob CD4+CD28- T-Lymphozyten eher mit aktuellen Ereignissen vergesellschaftet sind oder ob diese zu chronisch progredienten atherosklerotischen Gefäßveränderungen beitragen. Eine Erhebung von Langzeitdaten der vorliegenden Studiengruppe könnte das prognostische Potential der Zellen in Bezug auf atherosklerotisch bedingte Ereignisse in einem Kollektiv mit niedrigem Risiko vaskulärer Ereignisse untersuchen.

Die Datenlage weist darauf hin, dass CD4+CD28- T-Lymphozyten am atherosklerotischen Geschehen beteiligt sind. Möglicherweise sind TNF $\alpha$ -Blocker atheroprotektiv, indem sie die Zahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten erniedrigen. Auch eine selektive Inhibition der CD28-Zellen erlaubt Rückschlüsse auf deren Funktion. Des Weiteren ist unklar, was diese Zellen überhaupt triggert. Bisher sind Antigene in Verbindung mit diesen Zellen nicht ausreichend untersucht.

Für eine längerfristige Beobachtung erscheint es interessant, dass eine Abnahme der CD28-Zellen im Blut (Brugaletta et al., 2006) durch pleiotrop wirkende antiinflammatorische Statine und ACEI beschrieben ist. Es konnte gezeigt werden, dass Statine die Antigen-abhängige Aktivierung von T-Zellen blockieren (Kwak et al., 2000). Daher sind auch Untersuchungen denkbar, die die Wirksamkeit von ACEI und Statinen auf kardiovaskuläre Ereignisse und atherosklerotische Gewäßveränderungen in Abhängigkeit von der Senkung der CD4+CD28-Lymphozytenzahl beobachten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Untersuchung eine univariate, signifikant positive Assoziation zwischen der mittleren IMT und zwei Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes gezeigt werden. Insbesondere den CD4+CD28- T-Lymphozyten werden proatherogene Eigenschaften zugeschrieben. Dieser Zusammenhang ist in dem Niedrig-Risiko-Kollektiv allerdings nicht unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Funktion der CD4+CD28- T-Lymphozyten im atherosklerotischen Prozess, insbesondere in frühen Stadien, ist nicht ausreichend erforscht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

geben Anlass, die Rolle zellulärer Bestandteile des Blutes als Risikomarker atherosklerotischer Gefäßveränderungen und kardiovaskulärer Ereignisse weiter zu untersuchen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Afek A, Harats D, Roth A, Keren G, George J (2004) Evidence for the involvement of T cell costimulation through the B-7/CD28 pathway in atherosclerotic plaques from apolipoprotein E knockout mice. *Exp Mol Pathol* 76:219-23
2. Agewall S, Wikstrand J, Samuelsson O, Persson B, Andersson OK, Fagerberg B (1994) The efficacy of multiple risk factor intervention in treated hypertensive men during long-term follow up. Risk Factor Intervention Study Group. *J Intern Med* 236:651-9
3. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z (2006) Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 12:178-80
4. Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul PJ (2004) Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 35:2902-9
5. Ames PR, Tommasino C, Fossati G, Matsuura E, Margarita A, Saulino A, Lopez L, Scenna G, Brancaccio V (2005) Lymphocyte subpopulations and intima media thickness in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 14:809-13
6. Amyes E, McMichael AJ, Callan MF (2005) Human CD4+ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol* 175:5765-73
7. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A (1996) Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94:874-7
8. Binder CJ, Hökkö S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, Shaw PX, Palinski W, Witztum JL, Silverman GJ (2003) Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 9:736-43
9. Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW (2004) Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10:416-21
10. Bolinder G, Norén A, de Faire U, Wahren J (1997) Smokeless tobacco use and atherosclerosis: an ultrasonographic investigation of carotid intima media thickness in healthy middle-aged men. *Atherosclerosis* 132:95-103
11. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-7
12. Bots ML, Grobbee DE (2002) Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis. Review. *Cardiovasc Drugs Ther* 16:341-51
13. Bots ML, Baldassarre D, Simon A, de Groot E, O'Leary DH, Riley W, Kastelein JJ, Grobbee DE (2007) Carotid intima-media thickness and coronary atherosclerosis: weak or strong relations? *Eur Heart J* 28:398-406
14. Brugaletta S, Biasucci LM, Pinnelli M, Biondi-Zoccai G, Di Giannuario G, Trotta G, Liuzzo G, Crea F (2006) Novel anti-inflammatory effect of statins: reduction of CD4<sup>+</sup>CD28null T lymphocyte frequency in patients with unstable angina. *Heart* 92:249-50

15. Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK (2001) Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol* 37:127-36
16. Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2001) Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol* 167:3231-8
17. Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK (2000) Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation* 102:1114-9
18. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK (2002) Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 109:745-53
19. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hansson GK, Nicoletti A (2003) Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med* 9:10-7
20. Clerc G, Rouz PM (1997) Lymphocyte subsets in severe atherosclerosis before revascularization. *Ann Intern Med* 126:1004-5
21. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 15:788-91
22. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, García-Cardena G, Gimbrone MA Jr (2004) Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14871-6
23. Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E (2007) Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 38:2698-705
24. Damås JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, Gullestad L, Frøland SS, Aukrust P (2003) Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation* 107:2670-6
25. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V (2004) C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-97
26. Davies MJ (1996) Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. Review. *Circulation* 94:2013-20
27. de Boer OJ, Hirsch F, van der Wal AC, van der Loos CM, Das PK, Becker AE (1997) Costimulatory molecules in human atherosclerotic plaques: an indication of antigen specific T lymphocyte activation. *Atherosclerosis* 133:227-34
28. de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JJ (2004) Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. Review. *Circulation* 109:III33-8
29. Del Porto F, Laganà B, Nofroni I, Tinti F, Mitterhofer AP, D'Amelio R (2007) Effects of tumour necrosis factor alpha blockade on lipid profile in active rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46:1626-1627
30. De Michele M, Panico S, Iannuzzi A, Celentano E, Ciardullo AV, Galasso R, Sacchetti L, Zarrilli F, Bond MG, Rubba P (2002) Association of obesity and central fat distribution with carotid artery wall thickening in middle-aged women. *Stroke* 33:2923-8
31. De Palma R, Del Galdo F, Abbate G, Chiariello M, Calabró R, Forte L, Cimmino G, Papa MF, Russo MG, Ambrosio G, Giombolini C, Tritto I, Notaristefano S, Berrino L, Rossi F, Golino P (2006) Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism. *Circulation* 113:640-6

32. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ (2002) Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105:1158-61
33. Elhage R, Gourdy P, Brouchet L, Jawien J, Fouque MJ, Fiévet C, Huc X, Barreira Y, Couloumiers JC, Arnal JF, Bayard F (2004) Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 165:2013-8
34. Emeson EE, Robertson AL Jr (1988) T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol* 130:369-76
35. Espeland MA, Craven TE, Riley WA, Corson J, Romont A, Furberg CD (1996) Reliability of longitudinal ultrasonographic measurements of carotid intimal-medial thicknesses. Asymptomatic Carotid Artery Progression Study Research Group. *Stroke* 27:480-5
36. Falk E, Shah PK, Fuster V(1995) Coronary plaque disruption. Review. *Circulation* 92:657-71
37. Ferrières J, Elias A, Ruidavets JB, Cantet C, Bongard V, Fauvel J, Boccalon H (1999) Carotid intima-media thickness and coronary heart disease risk factors in a low-risk population. *J Hypertens* 17:743-8
38. Fox CS, Polak JF, Chazaro I, Cupples A, Wolf PA, D'Agostino RA, O'Donnell CJ; Framingham Heart Study (2003) Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study. *Stroke* 34:397-401
39. Freedman DS, Flanders WD, Barboriak JJ, Malarcher AM, Gates L (1996) Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men. *Ann Epidemiol* 6:299-306
40. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145:33-43
41. Gariépy J, Massonneau M, Levenson J, Heudes D, Simon A (1993) Evidence for in vivo carotid and femoral wall thickening in human hypertension. Groupe de Prévention Cardio-vasculaire en Médecine du Travail. *Hypertension* 22:111-8
42. Gariépy J, Salomon J, Denarié N, Laskri F, Mégnien JL, Levenson J, Simon A (1998) Sex and topographic differences in associations between large-artery wall thickness and coronary risk profile in a French working cohort: the AXA Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:584-90
43. Gariépy J, Denarie N, Chironi G, Salomon J, Levenson J, Simon A (2000) Gender difference in the influence of smoking on arterial wall thickness. *Atherosclerosis* 153:139-45
44. Gerli R, Schillaci G, Giordano A, Bocci EB, Bistoni O, Vaudo G, Marchesi S, Pirro M, Ragni F, Shoefeld Y, Mannarino E (2004) CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation* 109:2744-8
45. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN (1988) Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. Review. *Arch Pathol Lab Med* 112:1018-31
46. Glagov S, Vito R, Giddens DP, Zarins CK (1992) Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J Hypertens* 10:101-4
47. Grobbee DE, Bots ML (1994) Carotid artery intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. *J Intern Med* 236:567-73
48. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C (1997) IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 99:2752-61

49. Hackett D, Davies G, Maseri A (1988) Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Heart J* 9:1317-23
50. Hanefeld M, Koehler C, Schaper F, Fuecker K, Henkel E, Temelkova-Kurktschiev T (1999) Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. *Atherosclerosis* 144:229-35
51. Hansson GK, Holm J, Jonasson L (1989) Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 135:169-75
52. Hansson GK (2001) Immune mechanisms in atherosclerosis. Review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1876-90
53. Hansson GK (2002) The B cell: a good guy in vascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:523-4.
54. Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. Review. *N Engl J Med* 352:1685-95
55. Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-19
56. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C (1991) Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 134:250-6
57. Howard G, Brockschmidt JK, Coull BM, Becker C, Feibel J, Walker MD, McLeroy KR, Toole JF, Yatsu FM (1991) The community hospital-based stroke programs in North Carolina, Oregon and New York--V. Stroke diagnosis: factors influencing the diagnostic evaluation of patients following acute stroke. *J Clin Epidemiol* 44:293-301
58. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, Burke GL (1993) Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke* 24:1297-304
59. Howard G, Burke GL, Szklo M, Tell GS, Eckfeldt J, Evans G, Heiss G (1994) Active and passive smoking are associated with increased carotid wall thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med* 154:1277-82
60. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP (2001) T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation* 103:2610-6
61. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-8
62. Jonasson L, Tompa A, Wikby A (2002) Systemic T-cell activation in stable angina pectoris *Am J Cardiol* 89:754-6
63. Jonasson L, Tompa A, Wikby A (2003) Expansion of peripheral CD8+ T cells in patients with coronary artery disease: relation to cytomegalovirus infection. *J Intern Med* 254:472-8
64. Juonala M, Viikari JS, Räsänen L, Helenius H, Pietikäinen M, Raitakari OT (2006) Young adults with family history of coronary heart disease have increased arterial vulnerability to metabolic risk factors: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1376-1382
65. Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD (1997) Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. Review. *Stroke* 28:665-71
66. Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T (1993) Localization of T- lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423:433-42

67. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92:1084-8
68. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F (2000) Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6:1399-402
69. Leitinger N (2003) Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. Review. *Curr Opin Lipidol* 14:421-30
70. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 331:417-24
71. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM (1999) Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 100:2135-9
72. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM (2000) Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 101:2883-8
73. Liuzzo G, Biasucci LM, Trotta G, Brugaletta S, Pinnelli M, Digianuario G, Rizzello V, Rebuffi AG, Rumi C, Maseri A, Crea F (2007) Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 50:1450-8
74. Loimaala A, Rontu R, Vuori I, Mercuri M, Lehtimäki T, Nenonen A, Bond MG (2006) Blood leukocyte count is a risk factor for intima-media thickening and subclinical carotid atherosclerosis in middle-aged men. *Atherosclerosis* 188:363-9
75. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M (2006) Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke* 37:87-92
76. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M (2007 a) Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 115:459-67
77. Lorenz MW, Sitzer M, Markus SH, Bots ML, Rosvall M (2007 b) Response to Letter Regarding Article, "Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis" *Circulation* 116:e318
78. Ludewig B, Freigang S, Jäggi M, Kurrer MO, Pei YC, Vlk L, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H (2000) Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12752-7
79. Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP (2005) Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. Review. *Curr Dir Autoimmun* 8:25-54
80. Major AS, Fazio S, Linton MF (2002) B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1892-8
81. Makita S, Nakamura M, Hiramori K (2005) The association of C-reactive protein levels with carotid intima-media complex thickness and plaque formation in the general population. *Stroke* 36:2138-42
82. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85:e17-24
83. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M (2002) A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196:887-96

84. Michnovicz JJ, Hershcopf RJ, Naganuma H, Bradlow HL, Fishman J (1986) Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N Engl J Med* 315:1305-9
85. Millonig G, Malcom GT, Wick G (2002) Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis* 160:441-8
86. Murray CJ, Lopez AD (1997) Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-42
87. Mykkänen L, Zaccaro DJ, O'Leary DH, Howard G, Robbins DC, Haffner SM (1997) Microalbuminuria and carotid artery intima-media thickness in nondiabetic and NIDDM subjects. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Stroke* 28:1710-6
88. Nadareishvili ZG, Li H, Wright V, Maric D, Warach S, Hallenbeck JM, Dambrosia J, Barker JL, Baird AE (2004) Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology* 63:1446-51
89. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM (2002) T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation* 105:570-5
90. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:842-51
91. Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggesi L, Rostagno C, Gensini GF, Abbate R (1997) Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation* 95:1806-12
92. Oren A, Vos LE, Uiterwaal CS, Grobbee DE, Bots ML (2003) Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in healthy young adults: the Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) Study. *Arch Intern Med*. 163:1787-92
93. Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ (1997) Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. *Eur J Immunol* 27:1082-90
94. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002) Scavenger receptors in innate immunity. Review. *Curr Opin Immunol* 14:123-8
95. Pepys MB, Hirschfield GM (2003) C-reactive protein: a critical update. Review. *J Clin Invest* 111:1805-12. Erratum in: (2003) *J Clin Invest* 112:299
96. Persson J, Formgren J, Israelsson B, Berglund G (1994) Ultrasound-determined intima-media thickness and atherosclerosis. Direct and indirect validation. *Arterioscler Thromb* 14:261-4
97. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R (1986) Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 74:1399-406
98. Ramsamy, T.A., Rogers, L., Hasu, M., Siddiqui, M.M., Huynh, T., Tam, N.L., Yokoyama, W.M., and Whitman, S.C (2005) Natural killer cell deficiency impairs early-stage lesion development in apolipoprotein E null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:877-1084, e38 - e109
99. Ramshaw AL, Parums DV (1990) Immunohistochemical characterization of inflammatory cells associated with advanced atherosclerosis. *Histopathology* 17:543-52
100. Rizzello V, Liuzzo G, Brugaletta S, Rebuzzi A, Biasucci LM, Crea F (2006) Modulation of CD4(+)/CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor-alpha blockade in patients with unstable angina. *Circulation* 113:2272-7

101. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK (2003) Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112:1342-50
102. Robertson AK, Hansson GK (2006) T cells in atherogenesis: for better or for worse? Review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2421-32
103. Robertson AK, Hansson GK (2007) Letter to the Editor: Autoreactive CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T Cells and Acute Coronary Syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e19
104. Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A (1996) Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE <sup>-/-</sup> and LDL receptor <sup>-/-</sup> mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1013-8
105. Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. Review. *N Engl J Med* 340:115-26
106. Saba PS, Roman MJ, Longhini C, Scorzoni D, Pini R, Devereux RB, Ganau A (1999) Carotid intimal-medial thickness and stiffness are not affected by hypercholesterolemia in uncomplicated essential hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2788-94
107. Salonen R, Salonen JT (1991) Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men. *J Intern Med* 229:225-31
108. Sator MO, Joura EA, Gruber DM, Wieser F, Jirecek S, Tschugguel W, Huber JC (1998) The effect of hormone replacement therapy on carotid arteries: measurement with a high frequency ultrasound system. *Maturitas* 30:63-8
109. Sator MO, Joura EA, Gruber DM, Obruca A, Zeisler H, Egarter C, Huber JC (1999) Non-invasive detection of alterations of the carotid artery in pregnant women with high-frequency ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 13:260-2
110. Schulte-Altendorneburg G, Droste DW, Felszeghy S, Kellermann M, Popa V, Hegedüs K, Hegedüs C, Schmid M, Módis L, Ringelstein EB, Csiba L (2001) Accuracy of in vivo carotid B-mode ultrasound compared with pathological analysis: intima-media thickening, lumen diameter, and cross-sectional area. *Stroke* 32:1520-4
111. Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J (2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417:750-4
112. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8264-8
113. Simon A, Gariépy J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J (2002) Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. Review. *J Hypertens* 20:159-69.
114. Solberg LA, Eggen DA (1971) Localization and sequence of development of atherosclerotic lesions in the carotid and vertebral arteries. *Circulation* 43:711-24
115. Song L, Leung C, Schindler C (2001) Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 108:251-9
116. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Review. *Circulation* 89:2462-78
117. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1512-31

118. Statistisches Bundesamt (korrigierte Fassung vom 12.03.2007) Todesursachen in Deutschland 2005. [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
119. Stemme S, Holm J, Hansson GK (1992) T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb* 12:206-11
120. Steinberg D (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 8:1211-7
121. Stensland-Bugge E, Bønaa KH, Joakimsen O, Njølstad I (2000) Sex differences in the relationship of risk factors to subclinical carotid atherosclerosis measured 15 years later: the Tromsø study. *Stroke* 31:574-81
122. Tanigawa T, Kitamura A, Yamagishi K, Sakurai S, Nakata A, Yamashita H, Sato S, Ohira T, Imano H, Shimamoto T, Iso H (2003) Relationships of differential leukocyte and lymphocyte subpopulations with carotid atherosclerosis in elderly men. *J Clin Immunol* 23:469-76
123. Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH (1989) CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1333-7
124. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csiba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Fatar M, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS, Zannad F, Zureik M (2007) Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis* 23:75-80
125. Vallejo AN, Nestel AR, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ (1998) Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4+ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J Biol Chem* 273:8119-29
126. Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2004) T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. Review. *Trends Mol Med* 10:119-24
127. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89:36-44
128. Wang TJ, Nam BH, D'Agostino RB, Wolf PA, Lloyd-Jones DM, MacRae CA, Wilson PW, Polak JF, O'Donnell CJ (2003) Carotid intima-media thickness is associated with premature parental coronary heart disease: the Framingham Heart Study. *Circulation* 108:572-6. Erratum in: *Circulation* (2007) 115:e324
129. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS (2006) Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 355:2631-9
130. Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2003) CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. *Blood* 101:3543-9
131. Whitman SC, Rateri DL, Szilvassy SJ, Yokoyama W, Daugherty A (2004) Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1049-54
132. Whitman SC, Ramsamy TA (2006) Participatory role of natural killer and natural killer T cells in atherosclerosis: lessons learned from in vivo mouse studies. Review. *Can J Physiol Pharmacol* 84:67-75

133. Wilhelmsen L, Svärdsudd K, Korsan-Bengtzen K, Larsson B, Welin L, Tibblin G (1984) Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 311:501-5
134. Yeh ET (2005) High-sensitivity C-reactive protein as a risk assessment tool for cardiovascular disease. Review. *Clin Cardiol* 28:408-12
135. Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlichs CD (2004) Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis* 176:101-10
136. Zal B, Kaski JC, Arno G, Akiyu JP, Xu Q, Cole D, Whelan M, Russell N, Madrigal JA, Dodi IA, Baboonian C (2004) Heat-shock protein 60-reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 109:1230-5
137. Zal B, Baboonian C, Kaski JC (2007) Letter to the Editor: Autoreactive CD4+ CD28- T cells and acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e18
138. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK (2000) Transfer of CD4+ T Cells aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice *Circulation* 102:2919-2922
139. Zureik M, Touboul PJ, Bonithon-Kopp C, Courbon D, Berr C, Leroux C, Ducimetière P (1999) Cross-sectional and 4-year longitudinal associations between brachial pulse pressure and common carotid intima-media thickness in a general population. The EVA study. *Stroke* 30:550-5

## 7 Danksagungen

---

Der größte Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit PD Dr. med. Gunnar Heine. Er hat mir nicht nur das Thema zur Verfügung gestellt, sondern war während der gesamten praktischen Durchführung der Arbeit, bei der Auswertung der Daten und der Niederschrift jederzeit ansprechbar. Beeindruckt hat mich neben seiner Arbeitsdisziplin seine analytische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen. Seine Geduld habe ich insbesondere beim Schreiben der Arbeit strapaziert.

Herrn Prof. Dr. med. Fliser und Herrn Prof. Dr. med. Köhler möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion an der Medizinischen Klinik IV und die Unterstützung bei der Durchführung der Studie danken, auch Prof. Dr. med. Girndt gilt dieser Dank.

Herrn Dr. rer. nat. Christof Ulrich danke ich für die Hilfe bei der Arbeit im Labor, für die moralische Unterstützung und die Geduld während der praktischen Durchführung und die Anregungen zum Material und Methodenteil. Er hat neben Herrn PD Dr. med. Heine maßgeblichen Anteil am Gelingen der Doktorarbeit. Auch Frau Martina Wagner hat mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden – das gemeinsame Mittagessen und unsere Diskussionen zur politischen Wetterlage haben mir viel Spaß gemacht.

Ein besonderer Dank und ein Lob gilt den Mitarbeiterinnen der Betriebsärztlichen Dienststelle des Uniklinikums, allen voran Frau Briehl, Frau Metzger und Frau Weiser. Ihnen ist die Rekrutierung der Probanden zu verdanken. Bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Dr. med. Grenner und den anderen ärztlichen MitarbeiterInnen für die Kooperation und die Unterstützung des reibungslosen Studienablaufes.

Des Weiteren danke ich meinen Freunden des Dän-Clans, die meine Hilfsgesuche via Email ertragen haben. Vor allem Eva und Yvonne haben bei den technischen Problemen während der Niederschrift der Arbeit geholfen. Meiner Freundin Anja danke ich von ganzem Herzen. Meine Geschwister Ulrike, Hannes und Max haben mich moralisch unterstützt.

Meinen Eltern Ansgar und Elisabeth Blömer ist diese Arbeit gewidmet.

---

## 8 Anhang

---

### 8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tab. 1: Reagenzien, Medien, Puffer und Chemikalien	17
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	18
Tab. 3: Geräte	18
Tab. 4: Antikörper	19
Tab. 5: Färbeschema zur FACS-Analyse der Lymphozytenpopulationen	25
Tabl. 6: verwendete Computerprogramme	30
Tab. 7: Charakterisierung der StudienteilnehmerInnen	31
Tab.8: Darstellung der Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen	32
Tab. 9: Korrelation der Zellzahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten mit atherosklerotischen Risikofaktoren	40
Tab. 10: Vergleich der Zellzahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten mit nominalen atherosklerotischen Risikofaktoren	41
Tab. 11: Multiples Regressionsmodell der IMT unter Berücksichtigung der B-Zellen	42
Tab. 12: Multiples Regressionsmodell der IMT unter Berücksichtigung der CD4+CD28- T-Lymphozyten	43

---

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1: Beispielhafte Darstellung des B-Bildes zur Messung der IMT	23
Abb. 2: Prinzip der Durchflusszytometrie	24
Abb. 3: Gatingstrategie zur Bestimmung der NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten	27
Abb. 4: Gatingstrategie zur Bestimmung der T-Lymphozytensubpopulationen	28
Abb. 5: Korrelation der IMT mit dem Alter	34
Abb. 6: Korrelation der IMT mit dem BMI	34
Abb. 7: Korrelation der IMT mit dem systolischen Blutdruck	34
Abb. 8: Korrelation der IMT mit dem diastolischen Blutdruck	34
Abb. 9: Korrelation der IMT mit dem mittleren Blutdruck	34
Abb. 10: Korrelation der IMT mit dem Pulsdruck	34
Abb. 11: Korrelation der IMT mit dem Gesamtcholesterin	35
Abb. 12: Korrelation der IMT mit dem LDL-Cholesterin	35
Abb. 13: Korrelation der IMT mit dem HDL-Cholesterin	35
Abb. 14: Vergleich der IMT weiblicher und männlicher Studienteilnehmer	36
Abb. 15: Vergleich der IMT zwischen Rauchern und Nichtrauchern	36
Abb. 16: Vergleich der IMT der Studienteilnehmer mit und der ohne Diabetes mellitus	36
Abb. 17: Vergleich der IMT von Teilnehmern mit und ohne positive Familienanamnese für kardio- und cerebrovaskuläre Ereignisse	36
Abb. 18: Korrelation der IMT mit der Anzahl der Lymphozyten	38
Abb. 19: Korrelation der IMT mit der Anzahl der T-Lymphozyten	38
Abb. 20: Korrelation der IMT mit der Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten	38
Abb. 21: Korrelation der IMT mit der Anzahl der CD4+CD28- T-Lymphozyten	38
Abb. 22: Korrelation der IMT mit der Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten	38
Abb. 23: Korrelation der IMT mit der Anzahl der CD8+CD28- T-Lymphozyten	38
Abb. 24: Korrelation der IMT mit der Anzahl der Natürlichen Killerzellen	39
Abb. 25: Korrelation der IMT mit der Anzahl der B-Lymphozyten	39

### 8.3 Fragebogen

Fragebogen basierend auf: Rose, G. A.; Cardiovascular survey methods, 2nd. Ed. Geneva: WHO, 1982

Untersuchungsdatum \_\_. \_\_. 200\_\_

Proband \_\_\_\_\_ Geburtsdatum \_\_\_\_\_ Geschlecht \_\_\_\_\_

Körpergröße ohne Schuhe \_\_\_\_\_

Körpergewicht leicht bekleidet \_\_\_\_\_

01. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?

Ja

Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)

02. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Bergangehen oder raschen Gehen?

Ja

Nein (*falls Nein, weiter mit Frage 9*)

Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

03. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

Ja

Nein

04. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

Ich halte an oder laufe langsamer

Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 9*)

*Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen.*

05. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

Es kommt zu einer Erleichterung

Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)

06. Wie rasch?

Innerhalb von 10 Minuten.

Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).

07. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

Sternum (oberes oder mittleres Drittel)

Sternum (unteres Drittel)

Linksseitige vordere Brustwand

Linker Arm

*(alle Angaben notieren)*

08. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonstwo?

Ja (*notieren wo \_\_\_\_\_*)

Nein

---

09. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes, der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

- Ja
- Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Bein?

- Ja
- Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

- Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)
- Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

- Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.
- Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (*weiter Frage 19*)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Bergangehen oder raschen Gehen?

- Ja
- Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)
- Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

- Ja
- Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

- Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)
- Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

- Ich halte an oder laufe langsamer
- Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 19*)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

- Es kommt zu einer Erleichterung
- Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 19*)

18. Wie rasch?

- Innerhalb von 10 Minuten.
- Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

- Ja
- Nein

20. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

- Ja
- Nein

- 
21. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?  
 Ja  
 Nein
22. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?  
 Ja  
 Nein
23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?  
 Ja  
 Nein
24. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?  
 Ja  
 Nein
25. Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?  
 Ja  
 Nein
26. Haben Sie jemals geraucht?  
 Ja  
 Nein (*weiter mit Frage 31*)
27. Rauchen Sie aktuell?  
 Ja (*weiter mit Frage 28a*)  
 Nein (*nur Frage 28*)
28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht? \_\_\_\_\_  
28a. Blutentnahme Uhrzeit \_\_\_\_\_  
28b. Letzte Zigarette vor Blutentnahme \_\_\_\_\_  
28c. Insgesamt Anzahl Zigaretten vor Blutentnahme \_\_\_\_\_
29. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht? \_\_\_\_\_
30. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich am Tag geraucht? \_\_\_\_\_
31. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor der 60. Lebensjahr erlitten?  
 Ja  
 Nein
32. Hat eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?  
 Ja  
 Nein

33. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

Ja

Nein (*weiter mit Frage 35*)

34. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

Insulin

Blutzuckersenkende Tabletten

Diät

35. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mindestens 30 Minuten sportlich in einem Ausmaß, dass Sie ins Schwitzen kommen?

\_\_\_\_\_ (*falls „0“, weiter Frage 37*)

36. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

\_\_\_\_\_

37. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern?

Ja

Nein

38. Ist bei Ihnen eine Nierenerkrankung bekannt?

Ja

Nein (*weiter mit Frage 40*)

39. Welche Nierenerkrankung ist bei Ihnen bekannt?

\_\_\_\_\_

40. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wie viele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 0,35 l Bier, 0,120 l (ein „Achtel“) Wein oder 45 ml Spirituosen als ein Glas Alkohol.

Gesamt \_\_\_\_\_ Gläser

Bier \_\_\_\_\_ Gläser

Rotwein \_\_\_\_\_ Gläser

Weißwein \_\_\_\_\_ Gläser

Spirituosen \_\_\_\_\_ Gläser

41. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?

Ja

Nein

42. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

\_\_\_\_\_

Nach 5 Minuten Ruhe

RR \_\_\_ / \_\_\_ rechts \_\_\_ / \_\_\_ links

HF \_\_\_

## 8.4 Lebenslauf

Name Lutz Tilmann Blömer

Geburtsdatum 20.09.1979

Geburtsort Bremen

### Schulbildung

1986-1999 Besuch der Grundschule und der Orientierungsstufe in Emstek und des Gymnasiums und Cloppenburg

1999 Allgemeine Hochschulreife

1999-2000 Zivildienst mit Ausbildung zum Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz in Cloppenburg

### Studium

Oktober 2000 Aufnahme des Humanmedizinstudiums an der Universität des Saarlandes

August/September 2002 Ärztliche Vorprüfung

Oktober 2002 Fortführung des Studiums an der Universität Würzburg

August 2003 Erstes Staatsexamen

April 2004 Fortführung des Studiums an der Universität des Saarlandes

März 2006 Zweites Staatsexamen

April 2006 Beginn des Praktischen Jahres

April 2007 Drittes Staatsexamen

### Beruflicher Werdegang

seit Oktober 2007 Assistenzarzt der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Göttingen