

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Renale Albuminausscheidung
und nichtinvasive
Endothelfunktionstestung mit hochauflösendem
Ultraschall
bei Typ-2-Diabetikern und Nicht-Diabetikern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Bettina Karen Braun
aus Rüsselsheim**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-U. Häring

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Jacob

Fordere viel von dir selbst und erwarte wenig von anderen,
so bleibt dir mancher Ärger erspart.

(Konfuzius)

Meinen Eltern in Liebe gewidmet.

I. Einleitung.....	S.1
II. Grundlagen.....	S.5
II.1. Arteriosklerose	S.5
II.2. Das intakte Endothel	S.6
II.3. Die gestörte Endothelfunktion = Endotheliale Dysfunktion	S.14
II.4. Mikroalbuminurie	S.24
III. Probanden und Methoden.....	S.27
III.1. Probanden	S.27
III.2. Studienablauf	S.28
III.3. Methoden	S.29
III.4. Statistik	S.37
IV. Ergebnisse.....	S.38
IV.1 Probanden	S.38
IV.2. Vergleich der Endothelfunktionsparameter	S.41
IV.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	S.48
V. Diskussion.....	S.49
V.1. Diskussion der Methodik	S.49
V.2. Diskussion der Ergebnisse	S.52
VI. Limitation und Ausblick.....	S.61
VII. Zusammenfassung.....	S.62
VIII. Literaturverzeichnis.....	S.65
IX. Danksagung.....	S.80
X. Lebenslauf.....	S.81

I. Einleitung

In den westlichen Industrienationen sind kardiovaskuläre Erkrankungen trotz der bekannten epidemiologischen Erkenntnisse der letzten Jahre und der daraus abgeleiteten Therapieempfehlungen noch immer die führende Erkrankungsgruppe und die Hauptursache für Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung. Allein in Deutschland standen im Jahr 2001 die Herzkreislauferkrankungen mit 394 045 Todesfällen an erster Stelle der Todesursachenstatistik (76).

Typ-2-Diabetiker unterliegen zudem einem zwei- bis achtfach erhöhten Risiko für arteriosklerotische Komplikationen im Vergleich zur Normalbevölkerung (67). Sie stellen somit eine kardiovaskuläre Hochrisikogruppe dar, die primärprophylaktisch und therapeutisch schon frühzeitig behandelt werden muss.

Die Diagnostik der Arteriosklerose beschränkte sich in der Vergangenheit auf die Erfassung von Risikofaktoren und der Erkennung klinischer Manifestationen (KHK, ischämischer Insult, pAVK) einer schon lang vorhandenen Arteriosklerose.

Oft resultierte daraus lediglich eine sekundärpräventive Therapie. Diese Behandlungsweise birgt einerseits hohe Kosten für das Gesundheitssystem, andererseits stellt sie eine unbefriedigende Art der Medizin sowohl für den Patienten als auch für den behandelnden Arzt dar.

Deshalb besteht nicht nur von wirtschaftlicher Seite Interesse an einer früheren und effizienteren Diagnostik einer sich entwickelnden Arteriosklerose um echte primärpräventive Maßnahmen ergreifen zu können.

In den vergangenen Jahren wurden zahllose kardiovaskuläre Risikofaktoren und Indikatoren beschrieben, die bei dieser Frühdiagnostik hilfreich sein sollten. Nur wenige haben Einzug in den Klinikalltag gehalten.

Einer dieser Indikatoren ist die Mikroalbuminurie von der seit spätestens 1984 bekannt ist, dass sie vor allem bei Diabetikern ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bedeutet (47;78;110;173).

Aufgrund einer guten Datenevidenz bei diabetischen Kollektiven ist eine routinemäßige Bestimmung der renalen Albuminausscheidung sicherlich sinnvoll um ein Hochrisikokollektiv zu identifizieren, das durch intensiviertes Risikofaktoren-Management primärprophylaktisch behandelt werden muss. Unklar ist jedoch, durch welchen Pathomechanismus eine erhöhte renale Albuminausscheidung mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden ist. Häufig wird die Mikroalbuminurie mit einer systemischen Gefäßstörung gleichgesetzt. Hierbei stellt sich die Frage, ob eine Mikroalbuminurie - eigentlich Marker einer glomerulären Gefäßstörung – als Indikator einer beginnenden Arteriosklerose d.h. auch extrarenalen funktionellen Endothelstörung des systemischen Gefäßbettes gelten darf. Da eine Mikroalbuminurie mit einer erhöhten generalisierten vaskulären Permeabilität assoziiert ist (46), wurde die These aufgestellt, dass eine Mikroalbuminurie Ausdruck und Marker einer generalisierten endothelialen Dysfunktion ist und somit nicht nur als Indikator einer beginnenden Nierenschädigung bzw. als prognostischer Marker eines erhöhten kardiovaskulären Risikos, sondern auch als Zeichen einer beginnenden Arteriosklerose gelten darf (45;58;79;148).

Postuliert, die Mikroalbuminurie wäre tatsächlich Ausdruck einer systemisch gestörten Gefäßwandfunktion, dann könnte der alleinige Nachweis einer Mikroalbuminurie die aktuelle intra- wie auch die extrarenale Gefäßsituation abschätzen.

Fraglich ist jedoch, ob die alleinige Bestätigung einer Mikroalbuminurie ausreicht um eine Hochrisikogruppe für kardiovaskuläre Erkrankungen zu definieren oder ob es weitere prädiktive Faktoren gibt, die möglicherweise schon vor Auftreten einer Mikroalbuminurie auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko hinweisen.

Hierzu liefert die aktuelle Arteriosklerosetheorie neue Ansatzpunkte.

Noch vor wenigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass morphologisch fassbare Schädigungen des Endothels der initiale Schritt in der Entwicklung der Arteriosklerose sind. Mittlerweile wurde diese „Response-to-Injury-Theorie“ revidiert. Es gilt als gesichert, dass diesen morphologischen Veränderungen eine funktionelle Störung im Sinne einer Endothelialen Dysfunktion vorausgeht.

Konsequenz dieser Erkenntnis wäre nun eine Diagnostik, die bereits im asymptomatischen Stadium diese funktionellen Störungen aufdecken könnte, die dann unter gezielter Therapie reversibel wären. Schon in diesem frühen Stadium der funktionellen Endothelstörung müsste somit eine Interventionstherapie beginnen um die Inzidenz späterer Arteriosklerose-bedingter Erkrankungen zu senken.

Geeignete Funktionsparameter zu finden, die auf diese funktionellen Störungen des Endothels hinweisen, ist derzeit eines der primären Ziele der Arterioskleroseforschung.

Als einer dieser Funktionsparameter wird die Bestimmung des von-Willebrand-Faktors (vWF) angesehen.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass vor allem Störungen der NO-Produktion im Initialprozess der Arteriosklerose eine Schlüsselrolle einnehmen. Unterschiedliche Ansätze bestehen um zu einer Aussage über diese endotheliale Partialfunktion zu kommen. Eine indirekte Methode, die sich weitestgehend durchgesetzt hat, ist die Erfassung der flussmedierten Vasodilatation mittels hochauflösendem Ultraschall. Dieses Verfahren erfasst den Effekt einer verstärkten Scherkräfteinwirkung auf das Endothel. Die erhöhte lokale mechanische Kräfteinwirkung auf die Gefäßinnenwand führt über eine mechanobiochemische Transduktion zu einer vermehrten NO-Freisetzung aus den Endothelzellen. Dies initiiert konsekutiv eine lokale Vasodilatation des zuführenden Gefäßes, welche sonographisch gut erfasst werden kann (33;82). Als Maß für die Endothelfunktion gilt somit das Ausmaß der scherkräftinduzierten prozentualen Zunahme des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ruhedurchmesser.

Nur das gesunde, funktionierende Endothel führt zur erwarteten Dilatation. Bei zunehmender endothelialer Schädigung ist im Sinne der Endothelialen Dysfunktion diese Dilatation vermindert.

Fragestellung und Zielsetzung

Im Kontext dieser Erkenntnisse ist die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit, ob die bisher durchgeführte routinemäßige Bestimmung der renalen Albuminausscheidung zur Frühdiagnostik funktioneller Gefäßschäden ausreicht um eine kardiovaskuläre Hochrisikogruppe zu definieren oder ob nicht vielmehr eine gestörte NO-Produktion oder erhöhte vWF-Werte sensitivere Parameter einer beginnenden funktionellen Störung des Endothels darstellen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob eine Mikroalbuminurie als diagnostischer Marker einer glomerulären Endothelstörung stellvertretend für eine funktionelle Endothelstörung des systemischen Gefäßbettes überhaupt eingesetzt werden darf.

Hierbei überprüften wir in einem diabetischen und einem nicht-diabetischen Kollektiv die Hypothese, dass alle Marker voneinander unabhängige Störungen des Endothels aufzeigen, aber dass für eine frühzeitige Diagnostik die gestörte NO-Produktion einen sensitiveren Indikator darstellt als die renale Albuminausscheidung.

In einer Untergruppe untersuchten wir zudem, inwiefern die flussmedierte Vasodilatation einen im Vergleich zum im Plasma messbaren von-Willebrand-Faktor sensitiveren Surrogatparameter bei der Frühdiagnostik der Endothelialen Dysfunktion darstellt.

II. Grundlagen

II.1. Arteriosklerose

II.1.1. Definition Arteriosklerose

Die WHO definierte die Arteriosklerose als eine „...variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (127).

II.1.2. Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose

Bis Anfang der 90-iger Jahre ging man davon aus, dass in der Verletzung des Endothels die Ursache von arteriosklerotischen Veränderungen liegt – es galt die „Response-to-Injury-Theorie (129;133;134).

Unter dem Begriff „Injury“ wurde eine morphologische Schädigung der Endothelzellschicht verstanden. Inzwischen ist bekannt, dass diesen morphologischen Veränderungen bereits funktionelle Störungen bzw. inflammatorische Prozesse des Endothels vorausgehen, bei denen die einschichtige Endothelzellschicht morphologisch noch intakt ist (130).

So kommt es im Frühstadium der Arteriosklerose durch Irritationen des Endothels zu einer funktionellen Störung des Gefäßes – einer Endothelialen Dysfunktion. Diese Irritationen des Endothels führen zu einer Endothelzellaktivierung mit gesteigerter Endothelzellpermeabilität unter anderem für Lipoproteine, einer vermehrten Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (L-Selektine, Integrine und MCP-1) und endothelialen Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1, VCAM) und damit verbunden einer gesteigerten Adhäsion und Migration von Monozyten und T-Lymphozyten in den subendothelialen Raum. Vor allem oxidiertes LDL (150), aber auch Faktoren wie MCP-1, Interleukin-8 und den MCSF (macrophage colony-stimulating factor), fördern die Adhäsion und Migration der Monozyten und T-Lymphozyten und ihre Umwandlung zu Makrophagen.

Ausgehend von diesen entzündlichen Veränderungen kann es zur Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Media kommen, was zur Verdickung der Arterienwand und schließlich zur Bildung fibröser Plaques führt. Diese sind nur noch bedingt reversibel und bilden den Boden für die Stenosierung des Gefäßes (22;132).

II.2. Das intakte Endothel

II.2.1. Partialfunktionen des Endothels

Wie oben erläutert ist das Endothel also keine inerte innere Auskleidung der Blutgefäße, welche nur als Barriere zwischen Gefäßwand und strömendem Blut fungiert, sondern hat durch seine strategische Lage zwischen vorbeiströmendem Blut und Gefäßwand vielmehr zahlreiche Partialfunktionen:

1. Regulation des Gefäßtonus durch Bildung/ Freisetzung, Umbau und Abbau vasoaktiver Substanzen

z.B. durch ein Wechselspiel zwischen NO, Endothelin, Angiotensin I und Prostaglandinen.

2. Regulation von pro- und antikoagulatorischen Prozessen

(Thrombolyse/ Fibrinolyse) unter anderem durch Faktoren wie Thrombomodulin, PAI-1, tPA und den von-Willebrand-Faktor.

3. Regulation von Entzündungsreaktionen

Die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel durch Expression von Oberflächen-Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1) stellt einen wichtigen Schritt in der Einleitung einer inflammatorischen Reaktion dar.

4. Regulation der Gefäßpermeabilität

Durch Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle hat das Endothel z.B. einen regulierenden Einfluss auf die Durchtrittsrate von Makrophagen, T-Lymphozyten, wie auch von Lipoproteinen durch das Endothel.

Eine Störung der Permeabilitätsbarriere in der Niere ist Teilursache einer Mikroalbuminurie.

II.2.2. NO/ EDRF und die Physiologie

Der Pharmakologe Robert Furchgott und sein Kollege Zawadski beschrieben 1980 erstmals, dass in Aortenringen von Kaninchen die pharmakologische Testsubstanz Acetylcholin nur dann zu einer Dilatation des Gefäßes führt, wenn das Endothel intakt ist (61). Bei fehlendem oder geschädigtem Endothel erfolgt dagegen eine Vasokonstriktion infolge direkter Wirkung von Acetylcholin am glatten Gefäßmuskel. Sie zogen daraus den Schluss, dass das Endothel eine Substanz produzieren muss, deren Freisetzung durch Acetylcholin stimuliert wird. Furchgott und Zawadski nannten diese Substanz den „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) (16). Sechs Jahre später identifizierte Palmer et al. EDRF als Stickstoffmonoxid (NO)(117).

II.2.3. Synthese des NO

NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch Oxidation des Guanidin-Nitrogen-Endes gebildet, wobei L-Citrullin entsteht. Diese Reaktion wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) vermittelt, welches unter Ruhebedingungen exprimiert wird und in verschiedenen Isoformen in Endothelzellen, Thrombozyten, Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und im Gehirn vorkommt (18).

Die eNO-Synthase (eNOS = endotheliale NO-Synthase) wird konstitutiv in der Membran der gesunden Endothelzelle exprimiert. Sie ist ein Ca^{2+} / Calmodulin-abhängiges Enzym (141), das kontinuierlich NO freisetzt. Das Enzym benötigt als Cofaktoren unter anderem NAD(P)H und Tetrahydrobiopterin (BH_4) um NO zu bilden. BH_4 hat zudem einen stabilisierenden Einfluss auf die NO-Synthase (140).

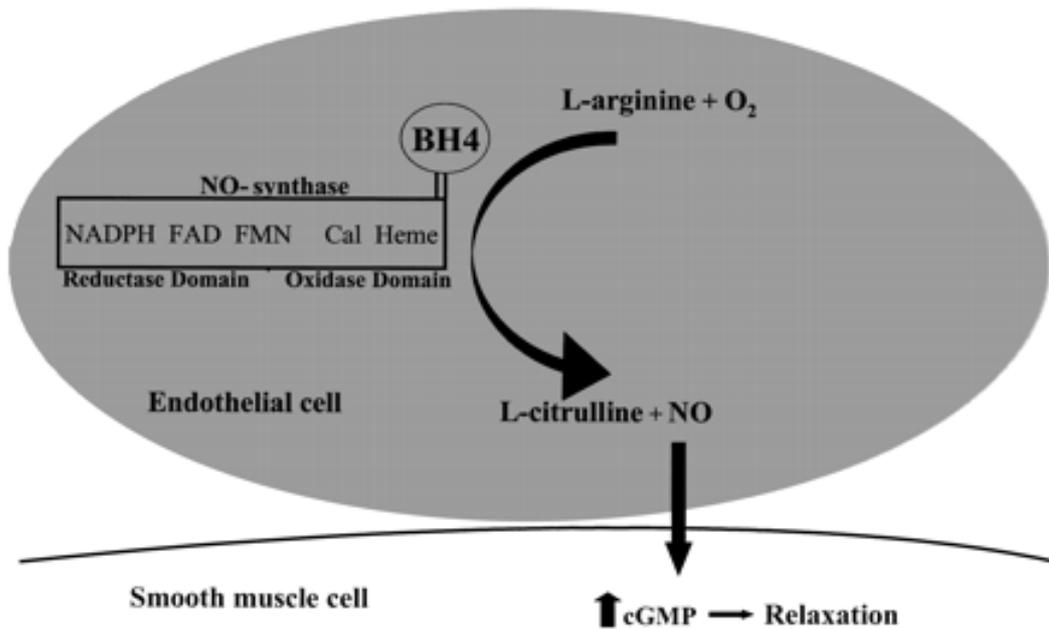


Abb.1: Aktivierung der eNO-Synthase durch Bindung von Tetrahydrobiopterin (BH4) (aus (154))

NO hat eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden (113) und wird schnell durch oxigeniertes Hämoglobin, Sauerstoffradikale/ Superoxidanionen ($ONOO^-$) zu Nitrat oxidiert bevor es mit dem Urin ausgeschieden wird (169).

Durch zahlreiche biochemische und physikalische Stimuli kann die eNO-Synthase auch zu gesteigerter NO-Synthese angeregt werden. Beispielsweise können die hormonellen Mediatoren Bradykinin, Acetylcholin oder Insulin die NO-Produktion rezeptorvermittelt und Calcium-abhängig erhöhen (84).

Auch Änderungen des Blutflusses und die dadurch auf die Endothelzelle einwirkenden Scherkräfte wirken aktivierend auf die endotheliale NO-Synthase (65;112).

Durch spezifische eNOS-Inhibitoren wie N^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) oder asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) kann die basale NO-Ausschüttung jedoch auch kompetitiv gehemmt werden (93;125).

II.2.4. Physiologische Wirkungsweisen von NO:



Abb.2: Physiologische Wirkungsmechanismen des NO
(→ fördert, | hemmt)

- **2.4.a. Regulation des Gefäßtonus**

Das in der Endothelzelle von der eNO-Synthase synthetisierte NO gelangt durch Diffusion in die glatte Gefäßmuskelzelle und aktiviert dort eine lösliche Guanylatzyklase. Nach Aktivierung katalysiert die Guanylatzyklase die Umwandlung von GTP in cGMP. cGMP selbst aktiviert eine cGMP-abhängige Proteinkinase, deren phosphoryliertes Substrat die Myosinkinaseaktivität hemmt, wodurch die Phosphorylierung von Myosin unterbunden wird. Durch diesen Mechanismus wird eine Interaktion von Myosin mit Aktin verhindert und somit der Gleitfilamentmechanismus unterbunden (19;165). Somit kommt es letztendlich zu einer Vasodilatation.

- **2.4.b. Scherkraft und NO-Produktion**

Wie in Absatz 2.3. erwähnt, können durch das zirkulierende Blut hervorgerufene Scherkräfte eine endothelabhängige Dilatation verursachen. Dieser autochthone Regulationsmechanismus ist insbesondere bei körperlicher Belastung und blutdrucksteigernden Situationen wichtig.

Wie in Abbildung 3 erkennbar, übertragen die durch das fließende Blut erzeugten Scherkräfte ihre Kraft über die luminale endotheliale Glykokalix auf das Zytoskelett der Endothelzelle (89).

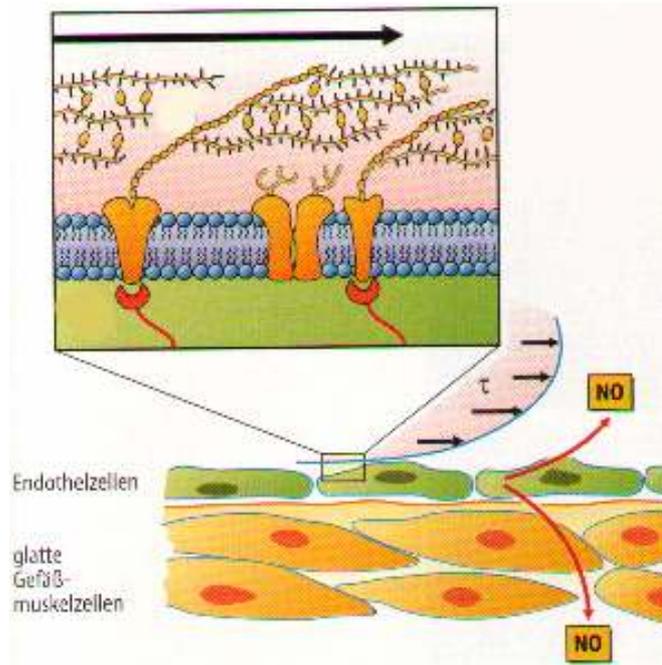


Abb.3: Wirkungen der Scherkräfte auf das Endothel aus (137)

Was genau für die Umwandlung des mechanischen Signals (Scherkräfte) in ein biochemisches Signal (NO-Produktion) verantwortlich ist, ist noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch scheint den Integrinen bei der mechanobiochemischen Transduktion eine entscheidende Rolle zuzukommen (114).

Studien haben gezeigt, dass diese Scherkräfte zwei intrazelluläre Signalwege auslösen können, die beide zu einer NO-Produktion führen: einen Ca^{2+} -sensitiven oder abhängigen und einen Ca^{2+} -insensitiven bzw. unabhängigen Weg. Bei einer kurzfristigen Anpassung des Endothels auf eine veränderte Kreislauflage kommt es Ca^{2+} -abhängig zu einer Öffnung von K^+ -Kanälen und somit zu einer Membranpotentialveränderung. Konsekutiv strömt vermehrt Ca^{2+} in die Zellen (116). Ca^{2+} wiederum bewirkt eine eNOS-Aktivierung mit beschleunigtem Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin. Die damit verbundene Steigerung der NO-Konzentration führt zu einer lokalen Vasodilatation des zuführenden Gefäßes im Sinne einer Autoregulation und physiologischen Anpassung an einen erhöhten intravasalen Blutfluss (34).

Bei längerer Stimulation (Minuten) kommt es Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängig zu einer eNOS Phosphorylierung durch eine Serin/ Threonin Proteinkinase, Akt/PKB, mit entsprechender Steigerung der eNOS-Aktivität (40). Als Anpassungsmechanismus auf eine chronische Stimulation (bis zu Stunden) kommt es zu einer Steigerung der Genexpression der eNO-Synthase.

- **2.4.c. Inhibition der Thrombozytenadhäsion bzw. – aggregation**

Eine weitere antiarteriogene Eigenschaft des NO ist durch seine Wirkung auf Thrombozyten bedingt. Durch Diffusion gelangt NO nach luminal, wo es auf gefäßwandnah strömende Thrombozyten trifft. Diese verfügen über einen vergleichsweise hohen Gehalt an löslicher Guanylatzyklase, die unter Stimulation von NO – analog zur glatten Muskelzelle – die Umwandlung von GTP zu zyklischem GMP (cGMP) katalysiert. Die Zunahme von cGMP im Thrombozyten führt zu einer Erhöhung der intrazellulären zyklischen AMP (cAMP), welches thrombozytenstabilisierend wirkt, da es den Ca^{2+} -Rückstrom aus dem Zytosol in die Granula der Thrombozyten verstärkt. Die Ca^{2+} -Ionenvermittelte Aggregation der Thrombozyten und die dadurch erhöhte Gefahr einer Thrombusbildung kann so verhindert werden (123).

- **2.4.d. Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen**

Eine weitere Eigenschaft des NO ist die Fähigkeit, die Proliferation glatter Muskelzellen zu hemmen. Versuche mit S-Nitro-N-Acetylpenicillamin und Natrium Nitroprussid – beides NO-Synthase-unabhängige-NO-Donatoren – an kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten zeigen, dass die mit diesen Substanzen inkubierten Zellkulturen eine signifikante Verringerung der Muskelzellproliferation aufweisen (63).

Auch Versuche mit eNOS-Inhibitoren zeigen einen Einfluss auf die DNA-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen (52).

Somit könnte NO über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus als Modulator der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen fungieren.

- **2.4.e. Inhibition der Monozytenadhäsion ans Endothel**

NO ist auch in der Lage die Monozytenadhäsion ans Endothel zu hemmen.

Eine Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung und L-Arginin zeigte bei Kaninchen eine signifikant verminderte Monozytenadhäsion an die Aorta und erhöhte Stickoxid-Produktions-Werte (NO₂ und NO₃) (156).

Versuche mit L-NAME wiederum zeigten bei Kaninchen und Katzen eine verstärkte Monozytenadhäsion und –emigration (25).

II.2.5. Hemmung der NO-Synthase

Neben anderen Modellen haben Methyl-Arginine, wie z.B. das asymmetrische Dimethylarginin (=ADMA) und N^G –Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), die als endogene kompetitive Inhibitoren von Arginin an der katalytischen Stelle der NO-Synthase wirken, die Bedeutung von NO für die Regulation des Gefäßtonus in vivo klar demonstriert (126).

Beide verhindern zudem kompetitiv den Transport von Arginin in die Zelle (92), wodurch es aufgrund mangelnden Arginins zu einer verminderten NO-Synthase kommt. Sie führen somit zu einer endothelabhängigen Vasokonstriktion.

Wird L-NMMA z.B. intraarteriell in die A.brachialis infundiert, so erhöht sich der periphere Widerstand in diesem Bereich und führt zu einer Blutflussabnahme von ca. 50% (159). Da L-NMMA keine eigene Konstriktor-Aktivität hat, resultieren seine vasokonstriktiven Wirkungen vollkommen aus der Hemmung der endogenen Synthese und Freisetzung von NO (158). Folglich wird der Gefäßtonus über eine basale kontinuierliche NO-Freisetzung moduliert, d.h. die kontinuierliche Freisetzung von NO aus dem Endothel hält die Gefäße in einem „erweiterten“ Zustand.

ADMA und L-NMMA heben also die Wirkung von NO auf, und führen nicht nur zu einer Vasokonstriktion, sondern auch zu einer vermehrten

Thrombozytenaggregation und –adhäsion ans Endothel.

Erhöhte ADMA-Werte kann man daher sowohl bei der Endothelialen

Dysfunktion im Urin oder Plasma messen, als auch bei mehreren endothelialen Risikofaktoren wie Insulinresistenz und Diabetes.

Auch sind erhöhte ADMA-Werte bei Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen zu finden (109;157) und eine Abnahme der ADMA-Konzentrationen durch Dialyse führt zu einer gesteigerten fluss-assoziierten Vasodilatation (41).

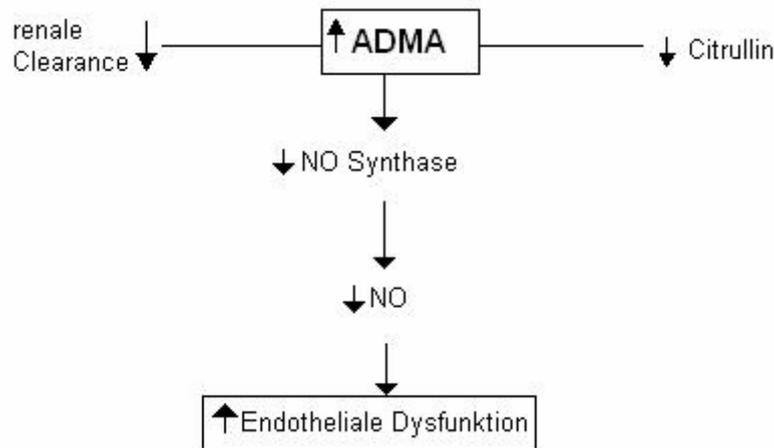


Abb.4: Wirkungsweise von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA)

II.2.6. von-Willebrand-Faktor

Der vWF ist ein multimerisches Glykoprotein, das unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch von Megakaryozyten und Thrombozyten gebildet wird (100). Er fördert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an geschädigte Gefäßregionen und dient zudem auch als stabilisierendes Carrierprotein des Gerinnungsfaktors VIII. Der vWF ist im Plasma, in Thrombozyten und Megakaryozyten und vor allem auch in Endothelzellen vorhanden und wird in höheren Konzentrationen vor allem von einem gestörten und/oder geschädigten Endothel freigesetzt (101).

II.3. Die gestörte Endothelfunktion (= Endotheliale Dysfunktion)

II.3.1. Was ist die Endotheliale Dysfunktion?

Die vielfältigen Funktionen des Endothels legen nahe, dass es keine einfache und klar zu umschreibende Definition des Begriffs der Endothelialen Dysfunktion gibt. Insbesondere wäre die Eingrenzung auf eine isolierte Partialfunktion eine kritisch zu wertende Vereinfachung. Der Begriff wird daher in erster Linie im Sinne einer „klinischen Beschreibung“ eingesetzt, die für eine Beeinträchtigung der normalen Endothelfunktionen (siehe II.2.1) steht.

Rubanyi versuchte 1993 die Endotheliale Dysfunktion „...als ein Ungleichgewicht zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren, zwischen koagulierenden und antikoagulierenden Mediatoren oder wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen“ zu definieren (135). Aus dieser Definition geht hervor, dass es in Anbetracht der vielfältigen Aufgaben des Endothels unterschiedliche Ansätze für Störungen gibt, die alle unter dem Begriff der Endothelialen Dysfunktion zusammengefasst werden können.

Eine reduzierte Bioverfügbarkeit des Signalmoleküls NO ist mit eines der ersten Kennzeichen einer Endothelialen Dysfunktion. Zudem beeinflusst NO, wie oben gezeigt, eine ganze Reihe wichtiger antiarterogener Eigenschaften der Gefäßwand und spielt dadurch eine Schlüsselrolle im Frühstadium der Arteriosklerose. Daher kann man zumindest unter praktisch klinischen Gesichtspunkten global die Endotheldysfunktion als verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit definieren, denn mit einer gestörten endothelabhängigen NO-Produktion sind in der Regel auch andere essentielle Funktionen des Endothels beeinträchtigt.

II.3.2. Die Endotheliale Dysfunktion als summativer Effekt bekannter und unbekannter Risikofaktoren

Die meisten kardiovaskulären Risikofaktoren wie z.B. Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus sind mit einer Endothelialen Dysfunktion assoziiert. Bestimmte Risikofaktorenkombinationen, wie sie z.B. beim Metabolischen Syndrom zusammentreffen, scheinen jedoch einen stärkeren Einfluss auf den Endothelstatus zu haben als andere. Aber nicht allein die kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmen das Maß der Endothelialen Dysfunktion, sondern auch lokale Faktoren wie beispielsweise Scherkräfte (damit z.B. Effekte körperlicher Aktivität).

Mit Sicherheit gibt es bisher noch unbekannte Faktoren, die einen schädigenden oder protektiven Einfluss auf die Endothelfunktion haben und somit zu dem „individuellen Endothelstatus“ beitragen.

Daher muss man davon ausgehen, dass die vorliegende Endothelfunktion nicht allein durch das klinisch diagnostizierbare individuelle Risikofaktorenprofil bestimmt werden kann, sondern vielmehr als ein integrierter Index aller Arteriosklerose-fördernder und –hemmender Faktoren (auch bislang unbekannter) eines Individuums angesehen werden muss.

Bonetti et al. bezeichnet deshalb die Endotheliale Dysfunktion als „ultimate risk of the risk factors“, also als eine Art „summativen Effekt“ aller potentiellen Risikofaktoren, die mit Grundlage für ein Arteriosklerose-förderndes Gefäßmilieu sind (16).

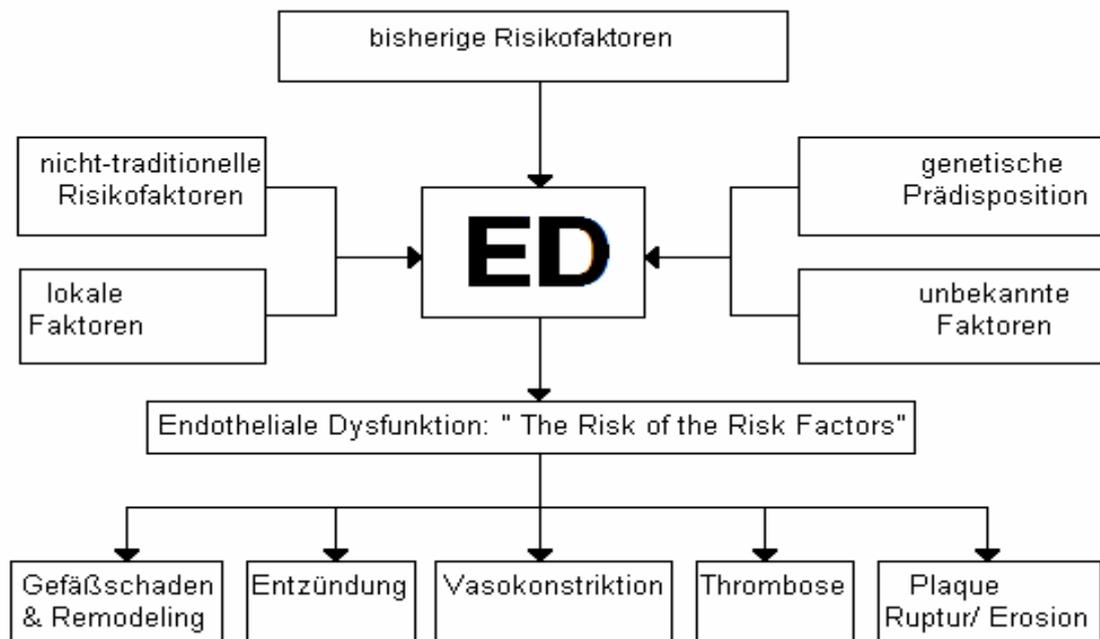


Abb.5: Endotheliale Dysfunktion als der „Risikofaktor der Risikofaktoren“
Übertragen aus (17)

II.3.3. Möglichkeiten zur Erfassung der Endothelfunktion

Die zentrale Rolle des Endothels in der Entstehung der Arteriosklerose ist unbestritten. Jedoch gibt es bisher keine allgemein anerkannte Standardmethode, mit deren Hilfe die Endothelfunktion global erfasst werden könnte. Indirekt versucht man deshalb die verschiedenen Partialfunktionen des Endothels z.B. durch Messung der endothelabhängigen Vasodilatation oder der im Plasma messbaren Regulationsproteine, die aus dem Endothel stammen, zu erheben (Tab.1).

Tab.1: Möglichkeiten der Endothelfunktionsmessung

Endothelfunktionsparameter	Interpretation der veränderten Endothelfunktion
gestörte endothelabhängige Vasodilatation	verringerte Synthese von NO, vermehrter Abbau von NO
vWF (80)	erhöhte prothrombogene und prokoagulatorische Aktivität
P-/E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1	erhöhte Permeabilität/ Adhäsion für Leukozyten; Entzündungsaktivität
t-PA und PAI-1 (139)	verschlechterte <u>profibrinolytische</u> Aktivität
Endothelin (136)	erhöhte Synthese von Vasokonstriktoren
sThrombomodulin (14;96)	verschlechterte antikoagulatorische Aktivität

tPA = Tissue-type plasminogen activator; PAI-1 = Plasminogen activator inhibitor-1; VCAM = vaskuläres s = soluble, a = erhöhte Plasma oder Serumwerte

II.3.4. Endotheliale Dysfunktion und das Metabolische Syndrom

Unter dem Metabolischen Syndrom versteht man ein mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiertes Konglomerat von Risikofaktoren, das bereits in der prädiabetischen Phase (z.B. im Stadium der pathologischen Glukosetoleranz) beginnt und damit in der Bevölkerung außerordentlich verbreitet ist.

Jeder einzelne dieser Risikofaktoren bedeutet ein erhöhtes Gefäß- und Diabetes-Risiko (70).

Zum Vollbild des Metabolischen Syndroms nach Hanefeld (70) gehören:

1. Übergewicht mit androider Fettverteilung (BMI = 30kg/ m²)
2. essentielle Hypertonie
(RR =140/90mmHg oder antihypertensive Therapie)
3. Dyslipoproteinämie mit Hypertriglyceridämie (= 1.7mmol/L) und erniedrigtem HDL-Cholesterin (< 0.9 mmol/L)
4. Glucose-Intoleranz bzw. Typ-2-Diabetes

Synonym für den Begriff des Metabolischen Syndroms wird auch der Begriff „tödliches Quartett“ verwendet, da das Metabolische Syndrom mit einem exzessiv erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko durch koronare, zerebrale und periphere Gefäßkrankheiten assoziiert ist (86).

Weitere Synonyme für das metabolische Syndrom sind:

- Insulin-Resistenz Syndrom
- Wohlstands-Syndrom (108)
- Metabolic syndrome X

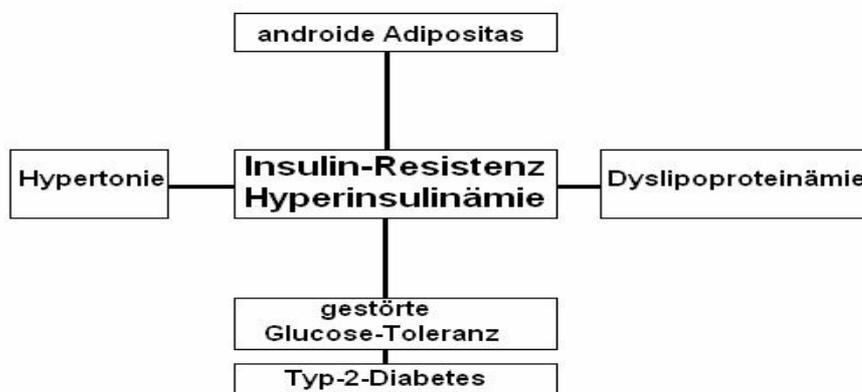


Abb.6: Das Metabolische Syndrom nach Hanefeld (70)

Wie aus Abb.6 deutlich hervorgeht, wird als zentrale Ursache und mögliches Bindeglied des Metabolischen Syndroms bzw. seiner Teilkomponenten eine zum Teil genetisch, aber auch durch Umweltfaktoren bedingte, vorwiegend muskuläre Unempfindlichkeit verschiedener Zellsysteme gegenüber dem körpereigenen Insulin angesehen (48;124). Diese führt kompensatorisch zu einer chronischen Hyperinsulinämie, so dass unter Glukose-Belastungssituationen noch eine Euglykämie resultiert. Erst wenn es zu einer Dekompensation der Pancreaszellen kommt und damit ein Sekretions-/Bedarfsmissverhältnis entsteht, resultiert ein offener, hyperglykämischer Typ-2-Diabetes.

Die Insulinresistenz ist zum Teil genetisch festgelegt und geht prospektiv dem Vollbild des metabolischen Syndroms voraus (68). Andererseits können Faktoren wie hyperkalorische Ernährung, Gewichtszunahme und Bewegungsmangel bei vielen Patienten diese Insulinresistenz/ Hyperinsulinämie im Sinne einer erworbenen Insulin-Resistenz verstärken (Abb.6).

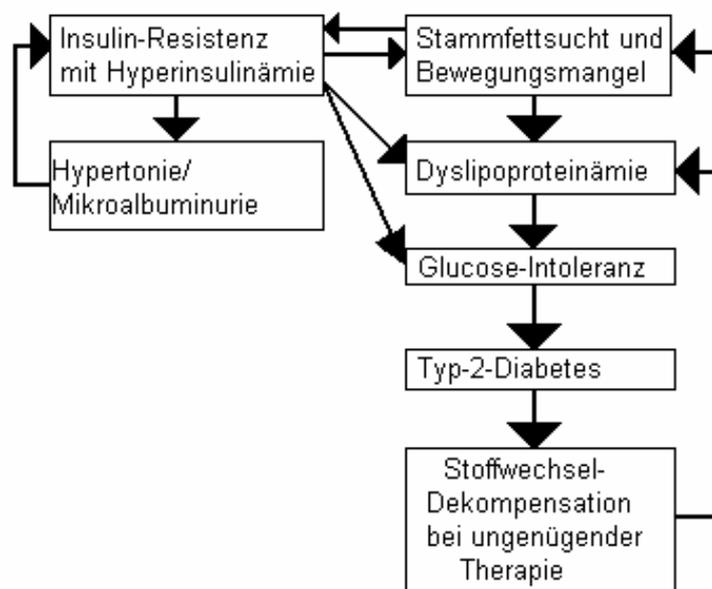


Abb.7: Metabolisches Syndrom als Prä-Typ-2-Diabetes
Verändert aus (107)

In der Regel tritt nicht nur eine Komponente des Metabolischen Syndroms auf, sondern das gesamte Risikobündel („Cluster“) (69). Alle Komponenten des Metabolischen Syndroms agieren miteinander und zusammen mit traditionellen Risikofaktoren und erhöhen so das kardiovaskuläre Risiko.

Dennoch steht jede der Teilkomponenten des Metabolischen Syndroms für sich schon für ein erhöhtes kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko.

Als initiierenden Mechanismus und wichtigen Faktor für das Fortschreiten der Arteriosklerose wird heutzutage die Endotheliale Dysfunktion gesehen, die schon in den frühesten Stadien des Metabolischen Syndroms vorhanden ist (8). Dabei ist die Beziehung zwischen dem Metabolischen Syndrom und der Endothelialen Dysfunktion außerordentlich komplex, denn die Endotheliale Dysfunktion kann sowohl Folge als auch ein aggravierender Faktor der Insulinresistenz sein.

So führt z.B. eine Endotheliale Dysfunktion zu einer Verschlechterung der Insulinempfindlichkeit durch eine verminderte Insulin-vermittelte, endothelabhängige Vasodilatation mit resultierender Verminderung der Muskelperfusion (9) und durch einen verlangsamten transendothelialen Insulintransport (24).

Dies könnte auch ein Bindeglied zu einem erhöhten Blutdruck (u.a. durch eine verringerte endothelabhängige Vasodilatation) darstellen (161).

Als weiterer Mechanismus führt eine endotheliale Funktionsstörung über eine verringerte endothelgebundene Lipoproteinlipase-Aktivität zu einer Verstärkung der pathogenetisch bedeutsamen Dyslipoproteinämie.

Pinkney et al. stellten 1997 sogar die Hypothese auf (118), dass die Endotheliale Dysfunktion der großen und mittelgroßen Arterien die Entstehung der Arteriosklerose widerspiegelt, während die Endotheliale Dysfunktion der Arteriolen und Kapillaren die Entstehung des Insulin-Resistenz-Syndroms fördert.

II.3.5. Endotheliale Dysfunktion und Diabetes Mellitus

Die Mechanismen, die bei Diabetikern zu einer Endothelialen Dysfunktion führen, sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. Trotz des häufig gleichzeitig bestehenden Hypertonus oder einer Dyslipidämie, die mit einer Endothelialen Dysfunktion einhergehen, trägt der Diabetes mit bestehender Hyperglykämie auch direkt zu der endothelialen Funktionsstörung bei.

In vielen Studien konnte eine enge Korrelation zwischen einer Endothelialen Dysfunktion und einem schlecht eingestellten Typ-1- (85;95;99;171) als auch Typ-2-Diabetes Mellitus aufgezeigt werden (6;56;103).

Potentielle Mechanismen, die zu einer Endothelialen Dysfunktion bei Diabetes führen (siehe Abb.9):

- **verminderte basale NO-Synthese**

Durch die Hyperglykämie kommt es zu einer verstärkten de novo Synthese von Diacylglycerolen (DAG) (91;170;172). DAGs führen zu einer Erhöhung der Proteinkinase-C-Aktivität, welche unter anderem eine Entleerung des zellulären NADPH Pools herbeiführt. NADPH stellt einen essentiellen Cofaktor der NO-Biosynthese dar; folglich kommt es zu einer verminderten basalen Synthese von NO (155).

Auch die Aldose-Reduktase wird bei pathologisch erhöhten Blutglukosekonzentrationen aktiviert und führt so zu einem verstärkten Glukosemetabolismus über den Polyolweg (64;73). Bei der Umwandlung von Glukose in Sorbitol benötigt die Aldose-Reduktase NADPH, welches andererseits als Cofaktor der NO-Synthase bei der NO-Synthese benötigt wird. Somit kommt es auch in diesem Fall zu einer verminderten NO-Synthese aus L-Arginin aufgrund einer NAD(P)H-Verarmung (siehe Abb.9).

- **gesteigerte Inaktivierung von NO**

Durch anhaltend hohe Plasma Glukosespiegel kommt es zu einer nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen, was zu einer vermehrten Bildung von „Advanced glycation end products“ (AGEs) führt (20), die mit NO reagieren (21). Dadurch führt eine Anhäufung von AGEs über einen gewissen Zeitraum zu einer gesteigerten NO-Inaktivierung und somit reduzierten NO-Verfügbarkeit. Des Weiteren führt die vermehrte Bildung von AGEs, als auch die Interaktion von AGE-Produkten mit auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten AGE-Rezeptoren (RAGE) (12), zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (152) (siehe Abb.9).

- **Erhöhung freier Sauerstoffradikale (oxidativer Stress)**

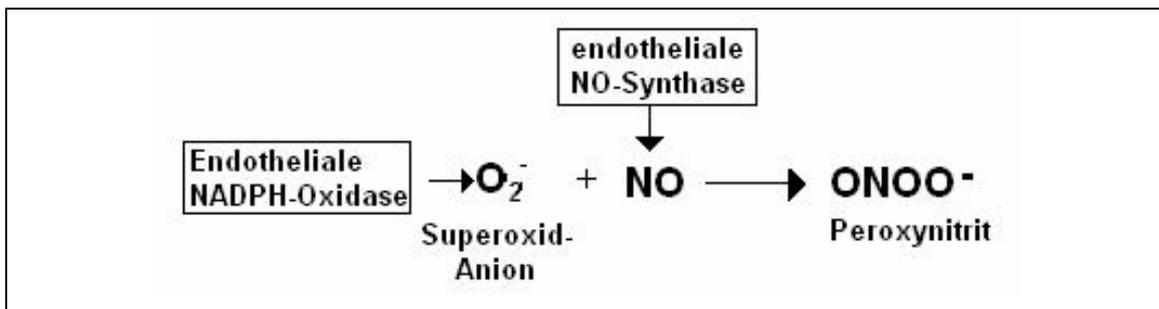


Abb.8: Peroxynitrit-Synthese

Bei einer längeren Exposition der endothelialen NO-Synthase gegenüber hohen Plasma-Glukose-Spiegeln, kommt es zu einer verstärkten eNOS-Genexpression und gesteigerten vaskulären NAD(P)H-Oxidase-Aktivität. Die erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität führt zu einer ausgeprägten Superoxidanionen Produktion (11;66), welche leicht mit NO reagieren. Wie in Abb. 8 ersichtlich führt die Interaktion von Superoxidanionen (O₂⁻) mit NO letztendlich zu einer verstärkten Peroxynitrit Synthese (ONOO⁻), welches ein starkes Oxidants ist, das Zellproteine und Lipoproteine nitrosylieren kann (10;142).

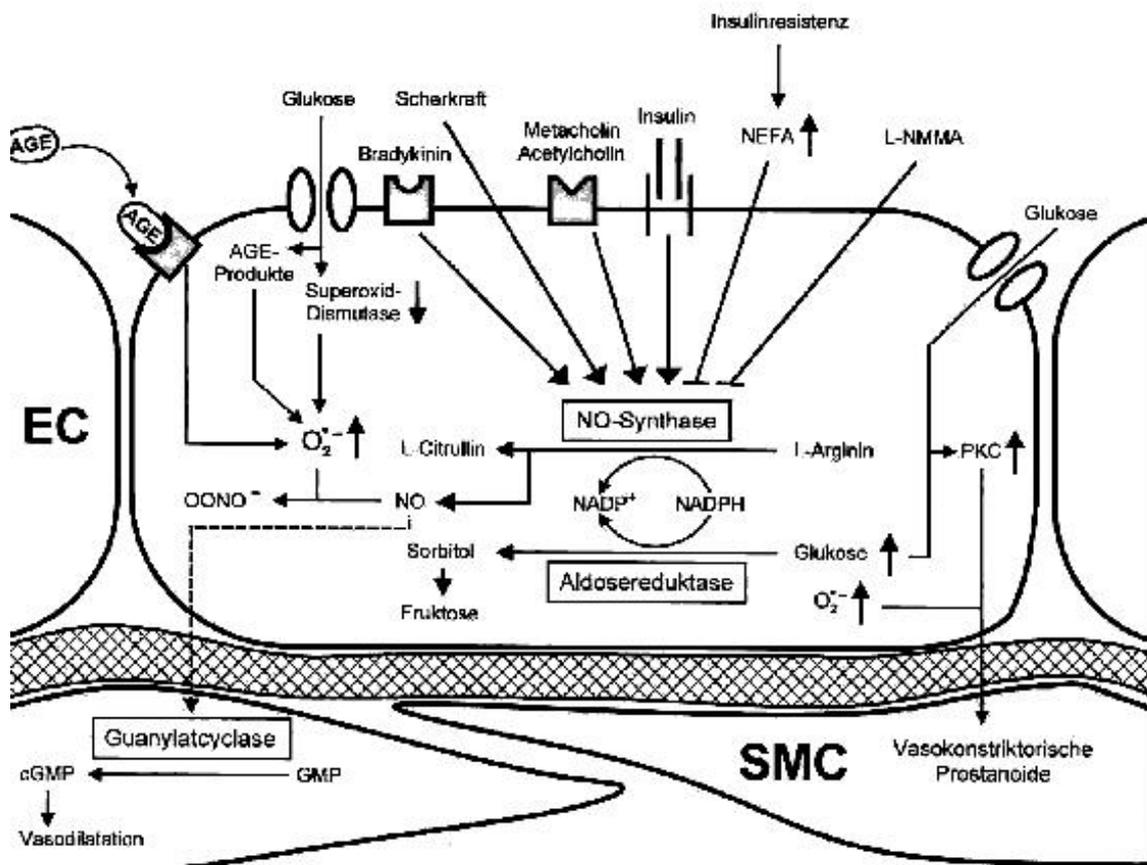


Abb. 9: Erhöhte Glukosewerte sind mit einer erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen assoziiert. Diese erfolgt sowohl intrazellulär über die Bildung sog. „advanced glycosylation end products“ (AGE), eine Aktivitätsminderung antioxidativer Schutzmechanismen wie der Superoxiddismutase, eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), als auch die Interaktion extrazellulärer AGE mit auf der Endothelzelle exprimierten AGE-Rezeptoren

Somit kommt es durch eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (oxidativer Stress) über verschiedene Mechanismen bei Diabetikern sowohl zu einer beschleunigten Inaktivierung von NO, als auch zu einer verminderten NO-Produktion)(4).

II.4. Mikroalbuminurie

II.4.1. Definition

Eine Mikroalbuminurie liegt vor, wenn 2 von 3 Messungen innerhalb eines Zeitraumes von einigen Wochen folgende Werte zeigen (106):

30-300 mg/24h	(im 24 h- Sammelurin)
20-200 µg/ min	(im Übernachtsurin)
20-200 mg/l	(im 1. Morgenurin)
20-200 mg/g Kreatinin	(im 2. Morgenurin)

Die mittlere normale Albuminausscheidung liegt zwischen 4 und 6µg/ min (151). Allerdings ist die Albuminkonzentration sehr variabel und hängt von vielen Faktoren wie beispielsweise körperlicher und sportlicher Aktivität, Proteinzufuhr, Harnwegsinfekten, Hypertonie und der Flüssigkeitszufuhr ab (62;111).

II.4.2. Pathobiochemie/physiologie der Mikroalbuminurie

Eine Mikroalbuminurie ist die Konsequenz einer gestörten renalen Gefäßpermeabilität und einer Veränderung der glomerulären Basalmembran. Unter physiologischen Umständen ist die glomeruläre Kapillarwand zum einen gröÙenselektiv, zum anderen ladungsselektiv. Die ladungsabhängige Permeabilität wird an der glomerulären Basalmembran hauptsächlich durch Heparansulfate erreicht, welche die Seitenketten von Glykosaminoglykanen darstellen. Damit die Heparansulfate aktiviert vorliegen, werden sie durch das Enzym N-Deacetylase sulfatiert. Obwohl der molekuläre Radius von Albumin eigentlich klein genug ist um durch die Poren der Basalmembran zu gelangen, verhindern die negativ geladenen Heparansulfate somit den Durchtritt von Albumin (160).

- **II.4.2.a. Mikroalbuminurie und Diabetes mellitus**

Bei Diabetikern mit Mikroalbuminurie findet sich eine veränderte ladungsabhängige Permeabilität der glomerulären Basalmembran.

Bei einem weiteren Anstieg der renalen Albuminausscheidung kommt es zudem verstärkt zu einem Verlust der Größenselektivität der Basalmembran.

Diese pathophysiologischen Veränderungen sind Folge:

- eines erhöhten intraglomerulären Druckes
- eines Ungleichgewichts verschiedener Wachstumsfaktoren (erhöhte Aktivität von TGF- β 1 (Transforming Growth factor) (167) und basic fibroblast growth factor
- der vermehrten nicht-enzymatischen Glykosylierung von Laminin und Kollagen IV und verminderten Heparansulfat-Bindung (160).
- Verschmelzung von glykosylierten Endprodukte mit anionischen Seitenketten wie z.B. den Heparansulfaten (Neutralisation der negativen Ladungen) (128;162)
- einer verminderten Aktivität der N-Deacetylase durch die chronische Hyperglykämie und damit zu geringen Sulfatierung (Abnahme der Ladungsaktivität der Heparansulfate) (44)

Morphologisch findet sich eine verdickte glomeruläre Basalmembran, welche durch eine verstärkte Synthese und/ oder einen verminderten Abbau von Kollagen IV, Laminin und Fibronectin zustande kommt (1;166).

• II.4.2.b. Mikroalbuminurie bei Nicht-Diabetikern

Bisher ist wenig über die renale Funktion und Morphologie bei albuminurischen Nicht-Diabetikern bekannt. Pinto-Sietsma konnte im Jahr 2000 bei Nicht-Diabetikern zeigen, dass eine Mikroalbuminurie mit einer erhöhten Filtration, während eine Makroalbuminurie mit einer verminderten glomerulären Filtration einhergeht (119). Allerdings stehen weitere Studien bezüglich dieser These noch aus.

II.4.3. Möglichkeiten zur Erfassung der Albuminurie

Der „Goldstandard“ der Albuminuriebestimmung ist der 24-Stunden-Sammelurin. Diese Sammelmethode ist im praktischen Alltag, speziell unter ambulanten Bedingungen, problematisch, da die Handhabung schwierig ist und es somit leicht zu Sammelfehlern kommen kann. Insbesondere als Screeningtest muss ein Verfahren gewählt werden, das praktische Anwendbarkeit, klinische Aussagekraft und ökonomische Vertretbarkeit vereint. Hier hat sich vor allem die Morgenurin- bzw. die Gelegenheitsurinprobe im klinischen Alltag als praktikabel erwiesen.

Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Albuminbestimmungsverfahren sind in Tabelle 2 noch einmal übersichtlich dargestellt.

Tab.2: Bestimmungsmöglichkeiten der renalen Albuminausscheidung

	24-h-Sammelurin	Übernachturin	1.Morgenurin	Zufällige Probe
Einheiten	mg/ 24h	µg/min	mg/l oder mg/mmol	mg/l oder mg/mmol
Handhabung	schwierig	akzeptabel	leicht	leicht
Körperliche Aktivität	wichtig	nicht wichtig	nicht wichtig	wichtig
Intra-individuelle Variation	hoch	mäßig	mäßig	hoch
Bemerkung	selten angewandt	praktisch für Monitoring	ideal für Screening	für Screening brauchbar

III. Probanden und Methoden

III.1. Probanden

Das Studienkollektiv von insgesamt 129 Probanden setzte sich aus 56 Typ-2-Diabetikern und 73 Nicht-Diabetikern zusammen.

III.1.1. Einschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden alle Probanden mit einem Lumendurchmesser der Arteria brachialis zwischen 2.0 und 6.0 mm. Eine normale Nierenfunktion mit einem Serum-Kreatinin von $< 1,2$ mg/dl und eine Albuminausscheidung ≤ 200 μ g/min bzw. ≤ 200 mg/l waren zudem gefordert. Des Weiteren mussten die Probanden zwischen 18 und 75 Jahre alt sein. Für die Gruppe der Typ 2-Diabetiker galt als zusätzliches Einschlusskriterium ein HbA1c > 6.5 und < 10.0 [%].

III.1.2. Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien galten eine Makroalbuminurie (> 200 μ g/min bzw. > 200 mg /l), eine klinisch bzw. laborchemisch manifeste Hypothyreose oder anderweitige Erkrankungen mit Einfluss auf die Gefäßfunktion (z.B. akute Infekte). Schwangere oder stillende Frauen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

III.1.3. Rekrutierung der Probanden

Die Rekrutierung der 56 Typ-2-Diabetiker erfolgte über die Diabetesambulanz der Medizinischen Klinik Abt. IV der Universität Tübingen.

Die 73 Nichtdiabetiker wurden über das TÜFF-Projekt (Tübinger Familien Früherkennung) rekrutiert (164).

Das TÜFF-Projekt hat zum Ziel, das Erkrankungsrisiko für Typ-2-Diabetes bei Personen in Abhängigkeit von familiärer Diabetesbelastung und verschiedenen Umwelteinflüssen zu erfassen und präventive Maßnahmen zu erarbeiten.

III.1.4. Probandendaten

Das mittlere Alter der Diabetiker betrug 59 Jahre, das der nicht-diabetischen Gruppe lag bei 34 Jahren.

Von den 56 Typ-2-Diabetikern waren 21 Frauen (37,5%) und 35 Männer (62,5%). Bei den Nicht-Diabetikern war der Frauenanteil 57,5% und der Männeranteil 42,5%.

Alle Probanden gaben nach entsprechender Aufklärung und Aushändigung der Informationsblätter ihr schriftliches Einverständnis an den jeweiligen Projekten (Endothelfunktion bei Typ-2-Diabetes bzw. TUFF-Studie) teilzunehmen. Die Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt.

III.2. Studienablauf

Die Untersuchungen wurden in die Medizinische Klinik der Universität Tübingen durchgeführt.

Zunächst wurde die Aufklärung über den Studienablauf vorgenommen und anschließend die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Dann wurden Körpergewicht (kg) und Körpergröße (cm) des Probanden ermittelt und daraus der Body-Mass-Index (BMI) berechnet. Eine ausführliche Vorgeschichte einschließlich der Medikamentenanamnese wurde erhoben und Blut zur Bestimmung der unten angegebenen Laborparameter abgenommen.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der renalen Albuminausscheidung.

Vor der Endothelfunktionsmessung mittels Ultraschall wurde als Screeninguntersuchung bei allen nichtdiabetischen Probanden ein oraler Glukosetoleranztest zum sicheren Ausschluss eines Diabetes Mellitus durchgeführt.

Nach einer halbstündigen Ruhephase mit Ermittlung des Ruheblutdrucks wurde die Untersuchung der Endothelfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall vorgenommen.

III.3. Methoden

III.3.1. Anamnestisch erhobene Daten

- **Nikotinabusus**

Die Probanden wurden in die Gruppen Nicht-Raucher und Raucher eingeteilt. Rauchen wurde als ≥ 1 Zigarette, Zigarre oder Pfeife pro Tag definiert.

III.3.2. Gefäßparameter

- **Anatomie und Sonomorphologie des Gefäßes**

Zur Erfassung der Endothelfunktion mittels Ultraschall müssen folgende Überlegungen zur Anatomie und Sonomorphologie der Gefäßwand erläutert werden. Die Arterienwand besteht aus drei Schichten (von innen nach außen):

- Intima → wird von Endothelzellen gebildet
- Media → enthält glatte Muskelzellen
- Adventitia → besteht hauptsächlich aus Bindegewebe

Diese drei Schichten sind sonographisch jedoch nicht in gleicher Weise darstell- und messbar. Wendelhag et al. verglichen Anatomie und Sonomorphologie der Arterie und konnten dabei verschiedene Echozonen unterscheiden (168). Dabei fanden sie für alle anatomischen Strukturen ein sonomorphologisches Korrelat, mit Ausnahme der Intima. Deren Dicke liegt unterhalb der Auflösungsgrenze der Ultraschallmethode und ist daher nicht direkt nachweisbar. Die Intima erzeugt jedoch einen echoreichen Reflex, der vom Schallkopf weg in die Tiefe des Gewebes gerichtet ist. Die schallkopfnaher Intima erzeugt somit einen in das Gefäßlumen zeigenden Reflex, während die schallkopferne Intima einen Reflex erzeugt, der in den echoarmen Reflex der schallkopffernen Media reicht.

- Echozone 1 = Adventitia der schallkopfnahen Gefäß-Wand
- Echozone 2 = Media der schallkopfnahen Wand
- Echozone 3 = Reflex von der Intima der schallkopfnahen Wand
- Echozone 4 = Lumen des Gefäßes
- Echozone 5 = Reflex von der Intima der schallkopffernen Wand
- Echozone 6 = Media der schallkopffernen Wand
- Echozone 7 = Adventitia der schallkopffernen Wand

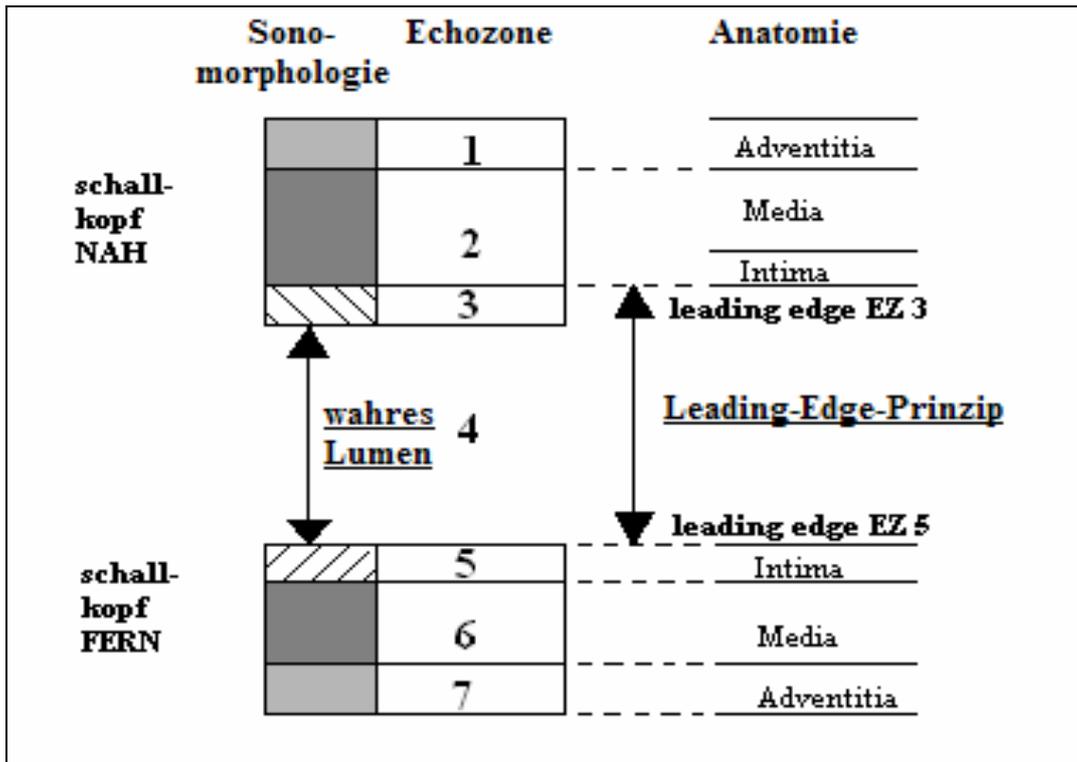


Abb.10: Vergleich Anatomie/ Sonomorphologie des Gefäßes mit Echozonen (EZ = Echozone), „Leading-Edge-Prinzip“

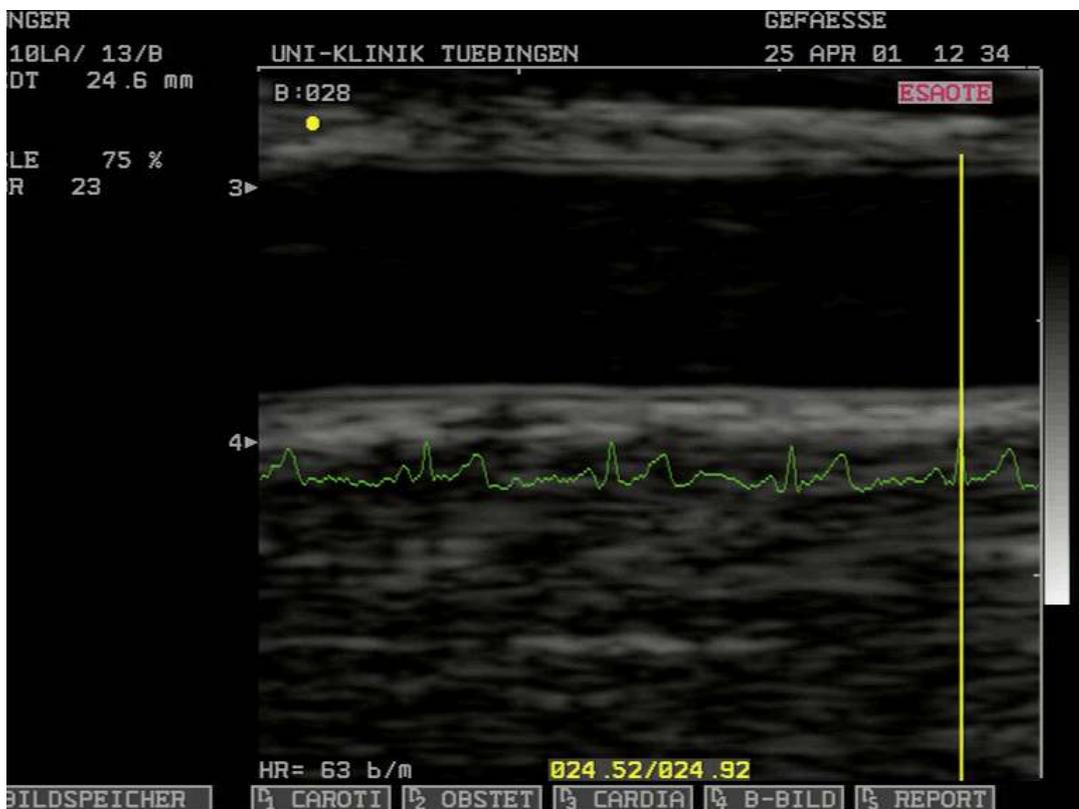


Abb.11: Darstellung der A. brachialis mittels eines 13 Mhz-Linear-Schallkopfes aus (2)

Wie in Abbildung 10 schematisch gezeigt, erscheinen die Gefäßwände im Ultraschallbild als Doppelreflexe. Darüber hinaus wird jede Echozone in ein „leading-edge“ und ein „far-edge“ unterteilt.

Als leading-edge wird jeweils der Beginn der echogenen Linie auf Höhe des Wand/ Lumen- Grenzreflexes schallkopfnah bzw. den Beginn der echogenen Linie auf Höhe des Lumen/ Gefäßwandreflexes schallkopffern bezeichnet. Als far-edge wird jeweils das schallkopferne Ende des Echoreflexes bezeichnet. Beide Grenzzonen entsprechen dem jeweils größten Impedanzsprung und erzeugen somit die sonomorphologischen Wandkonturen.

Die leading-edge ist unabhängig von der Geräteeinstellung immer gleich, wohingegen die far-edge in Abhängig von der Geräteeinstellung (z.B. bei hoher Eingangsempfindlichkeit wird der echogene Reflex breiter und damit die far-edge weiter nach schallkopffern verlagert) und der verwendeten Sendefrequenz variieren kann. Dadurch kann die gemessene Struktur oder Region als falsch dick oder falsch dünn gemessen werden.

In der vorliegenden Studie wurde deshalb, wie von den Fachgesellschaften empfohlen, nach dem Leading-Edge-Prinzip gemessen.

- **Erfassung der Endothelfunktion: FMD-Messung**

Entsprechend der von Celemajer 1992 publizierten Methode (26) wurde die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit in der vorliegenden Untersuchung mittels hochauflösendem Ultraschall als flussmedierte Dilatation (FMD) der Arteria brachialis entsprechend den Richtlinien der „International Brachial Artery Reactivity Task Force“ erfasst (36).

Der zu diesem Zweck verwendete 13 MHz Linear-Schallkopf (ESAOTE AU5 Idea Biomedica ® München) verfügt über eine maximale axiale Auflösung von 0,12 mm bei einer maximalen Eindringtiefe von 4,5 cm.

- **Untersuchungsablauf**

1) Untersuchungsbedingungen

Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) in einem klimatisierten ruhigen und abgedunkelten Raum durchgeführt. Dadurch wurden exogene Störfaktoren oder Stressreaktionen mit potentielltem Einfluss auf das Messergebnis ausgeschlossen (39).

Die Messungen erfolgten morgens nach einer 8-12 -stündigen Nüchternphase um postprandiale (z.B. Insulin- oder Glukoseinduzierte) Veränderungen der Perfusion auszuschließen (88). Zudem wurde durch den morgendlichen Messtermin den beschriebenen zirkadianen Schwankungen der Messergebnisse Rechnung getragen (53).

Eine Nikotinkarenz von mindestens 8 Stunden musste des Weiteren eingehalten werden (115) und auch Kaffee und Tee durften in dieser Zeit nicht eingenommen werden (51). Prämenopausale Frauen wurden in der ersten Zykluswoche untersucht um Östrogeneinflüsse auf die Endothelfunktion auszuschließen (71).

2) Lagerung der Probanden

Der Proband wurde in etwa 30° Grad halbliegender Position auf dem Rücken gelagert, so dass eine konstante bequeme Haltung für die Dauer der Untersuchung gewährleistet war. Der rechte Arm des Probanden wurde in $40-60^\circ$ Abduktionsstellung auf einem Kissen gelagert. Schmuck und Kleidungsstücke, die den Arm einschnürten, mussten abgelegt werden.

3) EKG-Elektroden und Ruheparameter

EKG-Elektroden wurden für die spätere R-Zacken getriggerte Messung der FAD am Probanden angebracht. Anschließend wurden nach einer halbstündigen Ruhepause Blutdruck (beidseitig) und Puls ermittelt. Die Messungen wurden mehrmals wiederholt bis stabile Kreislaufparameter unter Ruhebedingungen vorlagen.

4) Anlegen einer konventionellen Blutdruckmanschette am proximalen rechten Unterarm

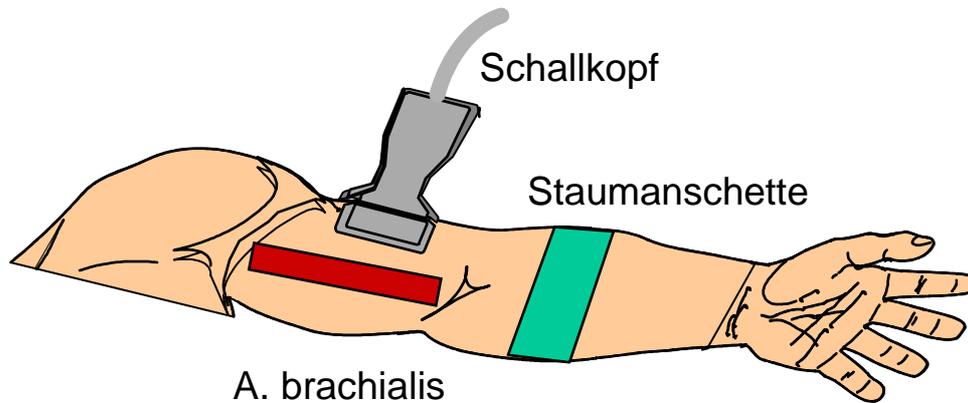


Abb.12: Anlegen einer Blutdruckmanschette aus (2)

5) Aufsuchen der A.brachialis und Darstellung im Längsschnitt

Ca. 2-10 cm proximal der Fossa cubitalis wurde die A.brachialis aufgesucht und im Längsschnitt dargestellt. Sobald sich die Gefäßwände als Doppelreflex darstellten, war eine geeignete Stelle zur Längsschnittdarstellung gefunden. Um Sicherzustellen, dass die Messung immer an derselben Stelle erfolgte, wurde die Schallkopfposition genau markiert.

6) Ermittlung des Gefäßruhedurchmessers

Mittels Cine-Loop wurde R-Zacken getriggert gemessen. Dies war notwendig, um Einflüsse der entsprechenden Herzzyklusphase auf den Gefäßdurchmesser auszuschließen. Es erfolgten drei Messungen pro Einstellung. Da das Gefäß insgesamt drei Mal neu eingestellt wurde lagen am Ende neun Diameterwerte vor aus denen der Mittelwert errechnet werden konnte.

7) Fünfminütige suprasystolische Stauung am Unterarm (distal der Messstelle)

Die arterielle Stauung musste 20-30 mmHg über dem ermittelten systolischen Blutdruckwert liegen und wurde mittels einer konventionellen Blutdruckmanschette durchgeführt.

Durch die Stauung wird distal der Messstelle eine komplette Ischämie erzeugt, die konsekutiv zu einer Vasodilatation führt.

8) Messung der endothelabhängigen, d.h. flussmediierten Dilatation (FMD)

Nach fünf Minuten wurde die Staumanschette gelöst, wodurch es zu einem vermehrten Bluteinstrom in die postischämisch vasodilatierten Unterarmgefäße kommt. Die erhöhte lokale mechanische Krafteinwirkung auf die Gefäßinnenwand in der zuführenden Oberarmarterie führt zu einer scherkraftinduzierten NO-Freisetzung aus den Endothelzellen (proximal des ischämischen Gebietes), was konsekutiv zu einer lokalen Vasodilatation führt. Als Maß für die Endothelfunktion gilt somit das Ausmaß der scherkraftinduzierten prozentualen Zunahme des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ruhedurchmesser (Angabe der FMD in Prozent). Die lokale Vasodilatation hat ihr Maximum in einem definierten Zeitfenster von 45-60 Sekunden nach Lösen der Staumanschette. Innerhalb dieser Einstellung wird über eine Cine-Loop-Analyse an drei verschiedenen QRS-Komplexen (Spitze der R-Zacken) jeweils drei Messungen durchgeführt werden, um die Variabilität des Messergebnisses möglichst gering zu halten.

Zur Dokumentation der induzierten Strömungszunahme musste basal und direkt nach Lösen der Staumanschette die zeitgemittelte Flussgeschwindigkeit in der A.brachialis mittels der PW-Duplexsonographie winkelkorrigiert gemessen werden.

9) Messung der endothelunabhängigen Dilatation (GTN)

Um vaskuläre Ausgangsbedingungen für die nächste Messung zu erhalten, musste eine Pause von mindestens 15 Minuten eingehalten werden. Um sicherzustellen, dass erneut vaskuläre Ausgangsbedingungen (Ruhetonus) vorlagen, wurde der Gefäßdurchmesser erhoben und mit dem Gefäßruhedurchmesser vom Beginn der Untersuchung verglichen.

Die NO induzierte Vasodilatation ist nicht nur von einer intakten Endothelzellschicht sondern auch von einer regelrechten Funktion der subendothelialen glatten Muskelzellschicht abhängig.

Bei gestörter Funktion der Muskelzellschicht, d.h. die Gefäßmuskelschicht reagiert nicht adäquat auf NO, kann auch über die endothelabhängige NO-vermittelte Vasodilatation keine Aussage mehr getroffen werden.

Diese Partialfunktion der Gefäßwand wurde mit Gabe eines externen NO-Donators überprüft. 3-4 Minuten nach sublingualer Applikation von 0,4 mg Glyceroltrinitrat (GTN) wurde die maximal induzierbare endothelunabhängige Dilatation der A.brachialis mittels Ultraschall ermittelt. Hierzu wurden wiederum drei Messungen durchgeführt.

Der Proband wurde vor der Messung über mögliche GTN-bedingte Nebenwirkungen wie z.B. Kopfschmerzen aufgeklärt.

III.3.3. von-Willebrand-Faktor

Der von-Willebrand-Faktor wurde quantitativ mit dem enzymimmunologischen In-vitro-Test ASSERACHROM® der Firma Roche und Diagnostica Stago (Chargen-Nummer 1 875 396) bestimmt (Angaben in %; Normalwerte 50-160%).

III.3.4. Urin / Albuminausscheidung

Zur genauen Quantifizierung der Proteinurie bei Nicht-Diabetikern im Rahmen der TÜFF-Studie wurde die renale Albuminausscheidung mittels einer 24-h Urin-Sammelprobe durchgeführt. Die Albuminkonzentration wurde im Nephelometer der Firma Behring Diagnostiks GmbH gemessen und auf µg/min umgerechnet.

Die Albuminausscheidung in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker wurde anhand einer spontanen Morgenurinprobe bestimmt (Angaben in mg/l). Hier wurde die Albuminkonzentration im Urin mittels N Antisera gegen Human-Albumin der Firma Dade Behring Marburg GmbH bestimmt.

III.3.5. Insulinsensitivität und Diabetes mellitus

- **Definition eines Diabetes Mellitus**

Ein Diabetes Mellitus wurde bei den Typ-2-Diabetikern folgendermaßen definiert:

- Behandlung mit Insulin
- Behandlung mit oralen Antidiabetika
- Nüchtern-Blutzucker > 126mg/l (= 7mmol/l)
(2-malige Bestimmung)

- **Oraler Glukose Toleranz Test (oGTT)**

Der oGTT wurde mit 40 g Glukose/ m² Körperoberfläche durchgeführt (Delta Pharma GmbH Pfullingen). Den Probanden wurde für die Blutabnahmen eine Venenverweilkanüle (Vasofix Braunüle B.Braun Melsungen AG) in eine Cubital- oder Handrückenvene gelegt. Somit konnte zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten die Messung der Plasmaglukose, des Seruminsulins und des C-Peptids unter geringer Belastung für den Probanden durchgeführt werden.

Für die Bewertung des oGTT wurden die von der American Diabetes Association (ADA) und der World Health Organization (WHO) 1998 festgesetzten Kriterien angewandt.

Nicht-diabetische Probanden mit einer Nüchtern-Plasma-Glukose-Konzentration von ≥ 126 mg/dl wurden von der Studie ausgeschlossen. Ein 2 h-Glukose-Wert von ≥ 140 mg/dl galt als gestörte Glukosetoleranz und stellte ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar.

III.3.6. Lipid-/ Blutzucker-Parameter

- **HbA1c**

Der HbA1c wurde mit der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) der Firma TOSOH gemessen und in % angegeben.

- **Cholesterin-gesamt, LDL, HDL, Triglyceride**

Das Gesamtcholesterin wurde mit Hilfe von Roche/Hitachi 747 bei 37° C bestimmt (Roche). Sowohl das LDL-Cholesterin und das HDL-Cholesterin, als auch die Triglyceride wurden mit Hilfe der Gerätes Hitachi 747 von der Firma Boehringer Mannheim bei 37° C gemessen.

III.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistical Package für Social Sciences (SPSS® für PC), sowie dem Statistikprogramm Jump 4.0. Die Angaben erfolgen entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung oder als Median und Spannweite. Die Gruppenvergleiche erfolgten mittels des Mann-Whitney U-Wilcoxon Rangsummen-Tests um einen potentiellen Einfluss durch eine nicht parametrische Verteilung auszuschließen. Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ im zweiseitigen Test wurde als statistisch signifikant gewertet.

IV. Ergebnisse

IV.1 Probanden

Von den ursprünglich 132 Probanden wurden drei Probanden wegen einer nachgewiesenen Makroproteinurie ausgeschlossen, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Patienten mit fortgeschrittener Nephropathie auszuschließen. Bei den verbliebenen 129 Probanden lag somit die Albuminausscheidung unter 200 µg/min bzw. unter 200 mg/l (Einschlusskriterium). Das Studienkollektiv setzte sich aus zwei verschiedenen Gruppen zusammen: 56 Typ-2-Diabetikern und 73 Nicht-Diabetikern.

IV.1.1. Anthropometrische Daten

Typ-2-Diabetiker: Das mittlere Alter betrug 59 Jahre (Spannweite 35 – 75). Die Geschlechterverteilung war mit 21 Frauen (37,5%) und 35 Männer (62,5%) statistisch ausgeglichen.

Der Mittelwert der Größe betrug $170,5 \pm 7,6$ [cm], das mittlere Gewicht $87,5 \pm 12,3$ [kg] und der errechnete BMI mit $30,1 \pm 3,6$ [kg/ m²] lagen deutlich über dem mittleren Gewicht und BMI der Nicht-Diabetiker. Die mittleren Blutdruckwerte lagen bei den Typ-2-Diabetikern mit einem systolischen Blutdruck von 149 ± 21 [mmHg] und einem diastolischen Blutdruck von 87 ± 11 [mmHg] leicht oberhalb der heute geforderten Zielkriterien.

Bei 8 Probanden wurde anamnestisch ein chronischer Nikotinkonsum erhoben.

Nicht-Diabetiker: Das mittlere Alter lag bei 34 Jahren (Spannweite 18 – 35). Bei den 73 Nicht-Diabetikern war die Geschlechterverteilung mit einem Frauenanteil von 57,5% (= 42 Frauen) und einem Männeranteil von 42,5% (= 31 Männer) nahezu ausgeglichen.

Der Mittelwert der Größe betrug $171,8 \pm 8,8$ [cm], das mittlere Gewicht $75,4 \pm 15,8$ [kg] und der daraus errechnete mittlere BMI $25,5 \pm 4,7$ [kg/m²]. Der mittlere systolische Blutdruck betrug 122 ± 10 [mmHg], der diastolische Wert 75 ± 9 [mmHg]. 19 Probanden hatten eine positive Nikotinanamnese.

IV.1.2. Stoffwechselfparameter

Typ-2-Diabetiker: Die Nüchtern-Blutzucker lag bei 155,6 mg/dl, der mittlere HbA1c bei $7,35 \pm 1$ [%]. Die Diabeteseinstellung war damit nicht für alle Studienteilnehmer zufriedenstellend.

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte der Lipidstoffwechselfparameter. Die Typ-2-Diabetiker zeigten hier ein für das Metabolische Syndrom typisches Fettstoffwechselfmuster mit erhöhten Triglyceriden und niedrigem HDL-Cholesterin.

Nicht-Diabetiker: Bei den Nicht-Diabetikern war der mittlere Nüchtern-Blutzucker 86,5 mg/dl. Zum sicheren Ausschluss einer Störung der Glukosetoleranz wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Die Werte zwei Stunden nach Glukosebelastung lagen bei $99,6 \pm 27,8$ [mg/dl]. Hier ergab sich ein normwertiger mittlerer HbA1c von $5,1 \pm 0,4$ [%].

Die Mittelwerte des Gesamtcholesterin, LDL und der Triglyceride lagen erwartungsgemäß niedriger, HDL höher als in der diabetischen Gruppe (Tab.3).

Tab.3: Stoffwechselfparameter der Diabetiker und Nicht-Diabetiker

	Typ-2-Diabetiker		Nicht-Diabetiker	
	Mittelwert	± SA	Mittelwert	± SA
Gesamtcholesterin (mg/dl)	215	± 37	204	± 37
HDL (mg/dl)	46	± 23	62	± 15
LDL (mg/dl)	140	± 25	125	± 33
TG (mg/dl)	180	± 95	119	± 87
Nü-BZ (mg/dl)	155,6	± 28,7	86,5	± 10,7
2h-BZ (mg/dl)	/	/	99,6	± 27,8
HbA1c (in %)	7,35	± 1	5,1	± 0,4

SA =Standardabweichung, TG=Triglyceride, Nü-BZ = Nüchternblutzucker

IV.1.3. Renale Albuminausscheidung

In der Gruppe der Typ-2-Diabetiker war die mediane Albuminausscheidung 16,5 mg/l bei einer Spannweite von 0 – 169 mg/l.

Bei den Nicht-Diabetikern belief sich die mediane Albuminausscheidung auf 11,5 µg/min (Spannweite 1,9 - 84 µg/min).

IV.1.4. Gefäßparameter

Typ 2-Diabetiker: Der mittlere Ruhediameter der A.brachialis betrug $4,01 \pm 0,6$ [mm]. Nach fünfminütiger Stauung betrug der mittlere Absolutwert der flussmedierten Dilatation $4,2 \pm 0,6$ [mm] (= Diameter post). Das entspricht einer prozentualen Dilatation von $4,75 \pm 2,1$ [%] (= FMD).

Nach Gabe von 0,4µg Glyceroltrinitrat (GTN) sublingual wurde ein mittlerer Gefäßdurchmesser von $4,53 \pm 0,6$ [mm] gemessen. Das entspricht einer Dilatation von $13,58 \pm 6,4$ [%] (GTN-D) gegenüber dem Ruhediameter.

Nicht-Diabetiker: Der mittlere Ruhediameter der A.brachialis betrug bei der Gruppe der Nicht-Diabetiker $3,68 \pm 0,6$ [mm]. Nach fünfminütiger Stauung betrug der Absolutwert der flussmedierten Dilatation $4,46 \pm 4,8$ [mm] (=Diameter post). Das entspricht einer Dilatation von $6,4 \pm 5,4$ [%] (= FMD). Nach Gabe von 0,4 µg Glyceroltrinitrat (GTN) wurde ein mittlerer Gefäßdurchmesser von $4,31 \pm 0,6$ [mm]. Das entspricht einer Dilatation von $17,53 \pm 8,6$ [%] (GTN-D).

IV.2. Vergleich der Endothelfunktionsparameter

Anhand mehrerer Vorstudien, einschließlich Vorstudien aus der eigenen Arbeitsgruppe an Typ-2-Diabetikern und einem Kollektiv gleich alter Nichtdiabetikern (5), wurde eine flussmedierte Vasodilatation von $< 5\%$ als pathologisch, eine FMD von $> 5\%$ als normale Endothelfunktion definiert. Die Evidenz für die Richtigkeit dieser Dichotomisierung wurde auch insofern bestätigt, als dass sie exakt dem Median der flussmedierten Vasodilatation in der Gruppe der hier untersuchten Typ-2-Diabetiker entspricht.

Sowohl die diabetische, als auch die nicht-diabetische Gruppe wurde den Ergebnissen aus der endothelialen Funktionsmessung entsprechend in eine Untergruppe mit normaler Endothelfunktion (FMD $> 5\%$) und eine Untergruppe mit gestörter Endothelfunktion (FMD $< 5\%$) eingeteilt.

Diese Untergruppen wurden als zentrale Fragestellung auf die renale Albuminausscheidung miteinander verglichen (siehe S.40 Tab.4 und 5).

IV.2.1 Vergleich eingeschränkte versus gute flussmedierte Vasodilatation bei Normoalbuminurie

Wie aus den Tabellen 4 und 5 hervorgeht, zeigte sich bei keiner der beiden normoalbuminurischen Untergruppen (Diabetiker und Nicht-Diabetiker) ein relevanter Unterschied in der Albuminausscheidung beim Vergleich von Probanden mit gestörter versus normaler flussmediierter Vasodilatation.

In der Gruppe der normoalbuminurischen Typ-2-Diabetiker lag die Albuminausscheidung bei $4,8 \pm 5,5$ [mg/l] bei Probanden mit gestörter, versus $4,6 \pm 5,1$ [mg/l] bei Probanden mit normaler endothelialer NO-Produktion.

Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund einer ansonsten ausgeglichenen Prävalenz weiterer Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms (systolischer/diastolischer Blutdruck, Glukosestoffwechsel, Lipidstatus, BMI) zu sehen.

Ebenso waren die basalen Gefäßdurchmesser in den Gruppen nicht unterschiedlich, so dass ein relevanter Einfluss auf die dargestellten Ergebnisse nicht anzunehmen ist.

Tab.4: Klinische und metabolische Variablen bei **normoalbuminurischen Diabetikern** mit gestörter und normaler flussmediierter Vasodilatation (FMD) der A. brachialis

	FMD < 5 %		FMD > 5 %	
	MW	± SA	MW	± SA
n	23		23	
Alter	60,8	± 5,8	57,0	± 8,5
Geschlecht (m/ w)	14 / 9		14 / 9	
Gewicht (kg)	87,4	± 10,8	87,9	±14,2
Nikotinabusus	9 / 14		8 / 15	
Größe (cm)	170	± 6	170	± 9
BMI (kg/m ²)	30,4	± 4,0	30,1	± 3,4
Albuminurie (mg/l)	4,8	± 5,5	4,6	± 5,1
Diameter basal (mm)	4,0	± 0,6	4,0	± 0,7
Diameter post (mm)	4,1	± 0,6	4,3	± 0,7
FMD (%)	3,1	± 1,2	6,6	± 1,3**
Diameter nach GTN (mm)	4,4	± 0,6	4,6	± 0,6
GTN-D (%)	11,7	± 6,2	14,6	± 6,9
Nü-Glucose (mmol/l)	8,6	± 1,5	8,5	±1,6
HbA1c (%)	7,5	± 1,0	7,1	±0,9
Gesamtcholesterin (mg/dl)	214	± 49	219	± 24
LDL-Cholesterin (mg/dl)	141	± 28	141	± 19
HDL-Cholesterin (mg/dl)	50	± 35	44	± 10
Triglyceride (mg/dl)	176	± 83	185	± 101
RR systolisch (mmHg)	151	± 22	145	± 18
RR diastolisch (mmHg)	88	±13	87	± 10

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, BMI = Body-Mass-Index; FMD = Flussmedierte Vasodilatation; Nü-Glukose = Nüchtern-Glukose; RR = Blutdruck; Diameter post = Diameter nach Ischämie; GTN-D = Vasodilatation nach Glyceroltrinitrat, **p < 0.001

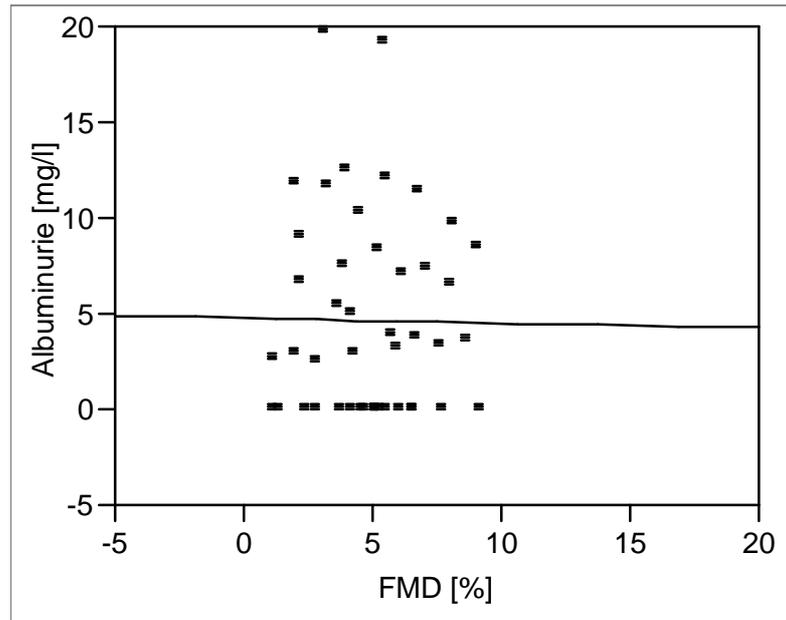
Tab. 5: Klinische und metabolische Variablen bei **normoalbuminurischen Nicht-Diabetikern** mit gestörter und normaler flussmediierter Vasodilatation (FMD) der A. brachialis

	FMD < 5 %		FMD > 5 %	
	MW	±SA	MW	± SA
n	31		34	
Alter (Jahre)	34,8	± 8,7	32,1	± 7,6
Geschlecht (m/ w)	12/19		17/17	
Nikotinabusus	5/24		3/ 30	
Gewicht (kg)	73,9	± 13,9	72,5	± 12,9
Größe (cm)	172	± 9	173	± 9
BMI (kg/m ²)	25,0	± 4,2	24,2	± 3,2
Albuminurie (µg/min)	5,1	± 2,6	4,9	± 2,7
Diameter basal (mm)	3,7	± 0,6	3,6	± 0,6
Diameter post (mm)	3,8	± 0,7	3,9	± 0,6
FMD (%)	2,4	± 1,7	9,9	± 5,0**
Diameter nach GTN (mm)	4,2	± 0,6	4,3	± 0,6
GTN-D (%)	14,8	± 7,6	20,1	± 9,3
Nü-Glucose (mmol/l)	4,8	± 0,5	4,7	± 0,7
HbA1c (%)	5,1	± 0,4	5,1	± 0,4
Gesamtcholesterin (mg/dl)	206	± 40	200	± 35
LDL-Cholesterin (mg/dl)	128	± 38	121	± 28
HDL-Cholesterin (mg/dl)	62	± 17	63	± 12
Triglyceride (mg/dl)	122	± 89	101	± 57
RR systolisch (mmHg)	121	± 11	121	± 8
RR diastolisch (mmHg)	74	± 10	73	± 5

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, BMI = Body-Index; FMD = Flussmedierte Vasodilatation; Nü-Glukose = Nüchtern-Glukose; RR = Blutdruck; Diameter post = Diameter nach Ischämie; GTN-D = Vasodilatation nach Glyceroltrinitrat, **p < 0.001

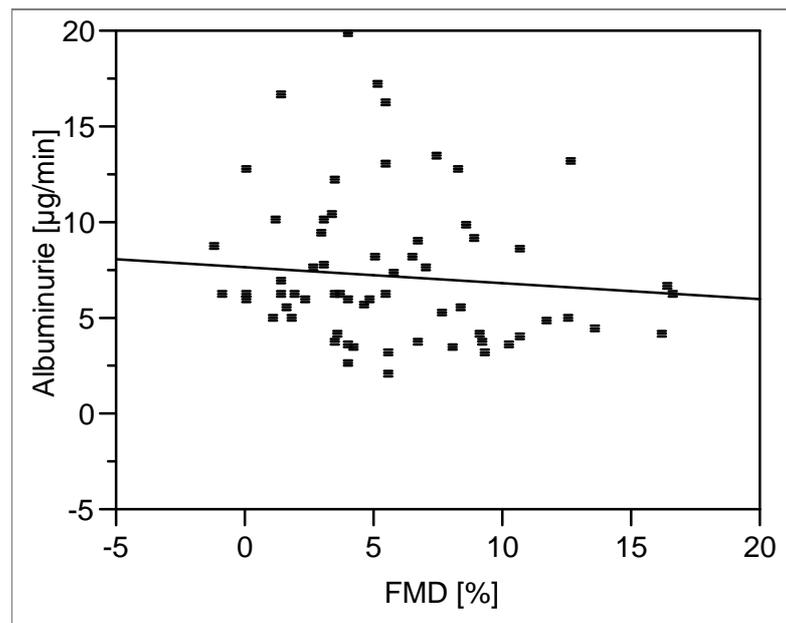
Auch aus der Abb.14 wird ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen der flussmedierten Vasodilatation und dem Grad der renalen Albuminausscheidung weder in der Gruppe der Diabetiker ($n = 56$; $p = 0.71$) noch in der Gruppe der Nicht-Diabetiker ($n = 73$; $p = 0.41$) vorhanden war.

Abb.13: Korrelation der FMD mit der renalen Albuminausscheidung bei normoalbuminurischen Typ-2-Diabetikern



FMD = flussmedierte Vasodilatation, $r = 0.03$, $p = 0.85$

Abb.14: Korrelation der FMD mit der renalen Albuminausscheidung bei normoalbuminurischen Nicht-Diabetikern



FMD = flussmedierte Vasodilatation, $r = -0.17$, $p = 0.18$

IV.2.2 Vergleich Mikroalbuminurie (MA) vs normale Eiweißausscheidung

Wie aus Tabelle 6 und 7 hervorgeht, war beim Vergleich der mikroalbuminurischen Probanden (n = 18) mit der Gruppe der normoalbuminurischen Probanden (n = 111) kein relevanter Unterschied in der endothelabhängigen Vasodilatation weder für die Gruppe der Typ-2-Diabetiker (FMD mit MA Mittelwert $4,3 \pm 1,8$ [%] versus FMD ohne MA Mittelwert $4,9 \pm 2,2$ [%]) noch für die Gruppe der Nicht-Diabetiker (FMD mit MA Mittelwert $6,7 \pm 4,0$ [%] versus FMD ohne MA Mittelwert $6,4 \pm 5,5$ [%]) erkennbar.

Allerdings zeigten sich die klassischen Risikofaktoren von relevantem Einfluss. So wiesen in der Gruppe der Nicht-Diabetiker Probanden mit Mikroalbuminurie signifikant höhere Blutdruckwerte (systolischer Blutdruck 134 ± 14 [mmHg] versus 121 ± 9 [mmHg]; $p = 0.05$; diastolischer Blutdruck 85 ± 12 [mmHg] versus 73 ± 7 [mmHg]; $p < 0.05$) und einen signifikant höheren BMI ($33,0 \pm 6,1$ [kg/m²] versus $24,6 \pm 3,7$ [kg/m²]; $p < 0.001$) auf als die Gruppe ohne Mikroalbuminurie (siehe Tab.7).

Tab.6: Vergleich der **Diabetiker** mit versus ohne Mikroalbuminurie

	Diabetiker mit MA		Diabetiker ohne MA	
	MW	±SA	MW	±SA
N	10		46	
RR systolisch	157	± 25	148	± 20
RR diastolisch	84	± 9	87	± 11
BMI (kg/m²)	29,3	± 3,4	30,3	± 3,7
FMD (%)	4,3	± 1,8	4,9	± 2,2
HbA1c	7,7	± 1,1	7,3	± 1
Nikotinabusus	0		8	

MA = Mikroalbuminurie, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, n = Anzahl, RR = Blutdruck, BMI = Body Mass Index, FMD = flussmedierte Dilatation

Tab.7: Vergleich der **Nicht-Diabetiker** mit versus ohne Mikroalbuminurie

	Nicht-Diabetiker mit MA		Nicht-Diabetiker ohne MA	
	MW	±SA	MW	±SA
N	8		65	
RR systolisch	134*	±14	121	± 9
RR diastolisch	85*	± 12	73	± 7
BMI (kg/m²)	33**	± 6,1	24,6	± 3,7
FMD (%)	6,7	± 4,0	6,4	± 5,5
HbA1c	5,2	± 0,5	5,1	± 0,4
Nikotinabusus	2		17	

MA= Mikroalbuminurie, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, n = Anzahl, RR = Blutdruck, BMI = Body Mass Index, FMD = flussmedierte Dilatation, *p = 0.05; **p < 0.001

IV.2.3 Korrelation des von-Willebrand-Faktors mit der flussmedierten Vasodilatation und der renalen Albuminausscheidung

In der Gruppe der Typ-2-Diabetiker wurde bei 26 Probanden zudem der von-Willebrand-Faktor (vWF) als weiterer Endothelparameter bestimmt.

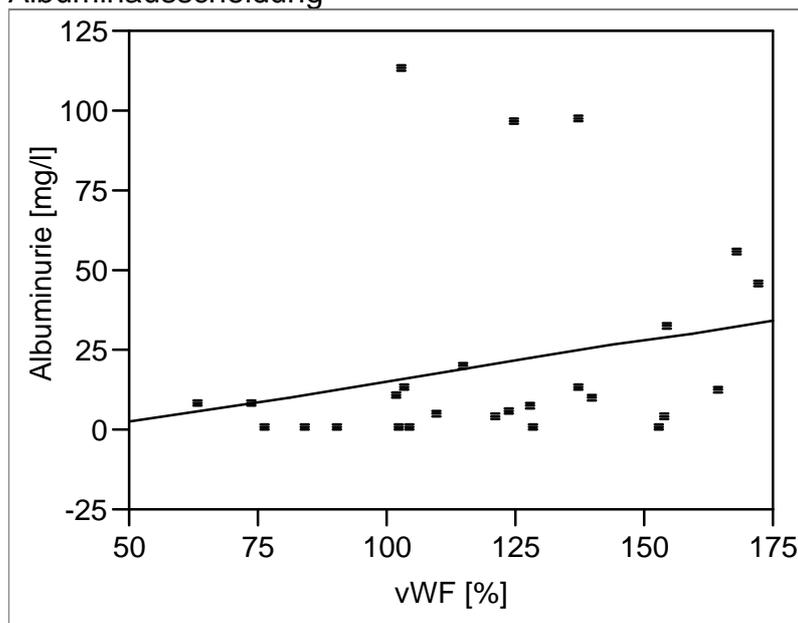
Tab.8: Klinische und metabolische Variablen der diabetischen Untergruppe

	Diabetiker	
	MW/Median	± SA/ Spannweite
N	26	
vWF (%)	120,5	± 29,9
Albuminurie (mg/l)	7,15	0 - 169
FMD (%)	5,0	± 2,0

vWF = von-Willebrand-Faktor; FMD = flussmedierte Vasodilatation

Hier fand sich im Gesamtkollektiv eine signifikante Korrelation (Spearman, $r=0.39$; $p=0.047$) der vWF-Werte mit der renalen Albuminausscheidung. Jedoch war kein Zusammenhang zwischen den vWF-Werten und der flussmedierten Vasodilatation der A.brachialis erkennbar (Spearman, $r=-0.09$; $p=0.6$).

Abb.15 : Korrelation des von-Willebrand-Faktors mit der renalen Albuminausscheidung



vWF = von-Willebrand-Faktor; $r = 0.39$; $p = 0.047$

IV.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei beiden normoalbuminurischen Untergruppen (Diabetiker und Nicht-Diabetiker) zeigte sich beim Vergleich von Probanden mit einer gestörten versus einer normalen flussmedierten Vasodilatation kein relevanter Unterschied in der Albuminausscheidung. Die restlichen Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms waren im Vergleich dieser beiden Gruppen ausgeglichen.

Auch beim Vergleich der normoalbuminurischen Probanden mit den mikroalbuminurischen Probanden zeigte sich kein relevanter Unterschied in der endothelabhängigen Vasodilatation. Allerdings hatten hier insbesondere die mikroalbuminurischen Probanden der Gruppe der Nicht-Diabetiker erhöhte Blutdruck- und BMI-Werte.

In einer Untergruppe der Typ-2-Diabetiker mit 26 Probanden konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den vWF-Werten und der renalen Albuminausscheidung aufgezeigt werden, wohingegen keine Korrelation der vWF-Werte mit den FMD-Werten erkennbar war.

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob im Rahmen einer optimalen Frühdiagnostik zur Erkennung kardiovaskulärer Hochrisikogruppen

1. die Bestimmung der renalen Albuminausscheidung als diagnostischer Marker einer generalisierten Endothelialen Dysfunktion ausreicht oder
2. ob andere Partialfunktionen des Endothels, wie die NO-Produktion bzw. Endothelfunktionsmarker (z.B. von-Willebrand-Faktor), bereits vor Auftreten einer erhöhten Albuminausscheidung gestört bzw. erhöht sind und somit besser zur frühen Identifikation von Hochrisikogruppen geeignet sind.

V.1. Diskussion der Methodik

V.1.1. Flussmedierte Vasodilatation

Die periphere Endothelfunktionsmessung mittels Ultraschall ist ein komplikationsarmes Verfahren, welches mit herkömmlichen Ultraschallgeräten mit Linearschallköpfen im Frequenzbereich von 7-13 Mhz durchgeführt werden kann. Dieses Verfahren erfasst den Effekt einer verstärkten Scherkrafteinwirkung auf das Endothel. Die erhöhte lokale mechanische Krafteinwirkung auf die Gefäßinnenwand führt über eine mechanobiochemische Transduktion zu einer vermehrten NO-Freisetzung aus den Endothelzellen. Dies initiiert konsekutiv eine lokale Vasodilatation des zuführenden Gefäßes, welche sonographisch gut erfasst werden kann (35;83).

Somit wird mit der sonographischen Messung der Vasodilatation immer die Endstrecke eines NO-Mangels nachgewiesen, unabhängig davon, wo genau die Ursache für die verminderte NO-Verfügbarkeit liegt (verminderte NO-Produktion durch z.B. NO-Synthase-Aktivität, Substrat-/Cofaktor-Mangel oder vermehrter NO-Verbrauch z.B. durch oxidativen Stress)(4). Den vielfältigen Einflussgrößen auf das endotheliale Redox-System mit seinen zentralen Auswirkungen auf Zellfunktion und NO-Signaling wird durch die Messmethode Rechnung getragen.

Zudem ist die Untersuchung beliebig häufig wiederholbar und kann auch bei Kindern problemlos angewendet werden. Des Weiteren kann auf eine arterielle Punktion und/oder Applikation von Pharmaka mit allen bekannten Risiken verzichtet werden, was die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen ausschließt.

Es müssen jedoch einige Voraussetzungen beim Einsatz in der täglichen Routine gegeben sein. So ist eine ausreichende Untersuchererfahrung notwendig um zuverlässige Messergebnisse zu erhalten und um intraindividuelle Schwankungen der Messergebnisse gering zu halten (3). Eine internationale Expertenkommission fordert für eine ausreichende Untersucherreliabilität die Durchführung von 100 Trainingsmessungen und eine gleich hohe jährliche Untersuchungszahl um eine ausreichende Qualifikation zu sichern und zu erhalten (38).

Zudem müssen die Untersuchungsbedingungen standardisiert sein, um den zahlreichen Einflussgrößen auf das Endothel (z.B. Stress, Temperatur, Ernährung (42), postprandial erhöhte Blutzuckerwerte (87), hormonelle Faktoren (72), vasoaktive Medikamente (37) etc.) gerecht zu werden. Limitiert ist der Einsatz der Untersuchung auch wegen des Zeitaufwandes von ca. 30 Minuten.

V.1.2. Mikroalbuminurie

Im Vergleich zur peripheren Endothelfunktionsmessung stellt die Messung der renalen Albuminausscheidung ein deutlich zeitgünstigeres und vor allem untersucherunabhängiges Verfahren dar.

In der Klinik bieten sich quantitative Messmethoden mit enzymgekoppelten Immunoassays, nephelometrischen oder immunoturbidimetrischen Analysen an (90), da sie schnell, automatisierbar, billig und gut reproduzierbar sind.

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Albuminexkretionsrate unabhängig von der Sammelmethode eine hohe Tag-zu-Tag Variabilität von 33-52% aufweist (57). Diese Variabilität lässt sich unter anderem in unterschiedlich hohem Maße auf körperliche Aktivität (28;120;163), Proteinzufuhr, Geschlecht (32), hohen Blutdruck bzw. Blutdruckschwankungen zurückführen.

Daher wird zur Diagnosestellung einer Mikroalbuminurie unter Alltagsbedingungen empfohlen, zwei Urinproben hinsichtlich einer Mikroalbuminurie zu untersuchen. Dies gestaltet sich vor allem im Rahmen größerer Studien, wie auch in der Praxis, als sehr (zeit-) aufwändig.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Eiweißausscheidung nur einmalig bestimmt, was die Aussagekraft der erhobenen Messwerte etwas einschränkt. Allerdings wurde potentiellen Einflussfaktoren große Aufmerksamkeit gewidmet. So wurden die Patienten eingehend darauf hingewiesen, keine sportlichen Aktivitäten während sowie kurz vor der 24-h-Sammelperiode zu betreiben. Zudem erhielten alle Patienten eine Ernährungsberatung zur Standardisierung der Protein- und Kohlenhydratzufuhr im Vorfeld der oralen Glukosebelastung.

V.1.3. von –Willebrand-Faktor

Vorteil bei der Bestimmung der Plasmakonzentration des von-Willebrand-Faktors ist, dass er leicht zu erfassen und untersucherunabhängig ist. Das größte Problem dieses attraktiven, jedoch teuren Markers stellt seine geringe Spezifität bei guter Sensitivität dar (102). Seine Konzentration im Plasma kann durch eine Vielzahl von pathologischen und physiologischen Bedingungen (z.B. Akut-Phase-Reaktion (122), Thrombozytenaktivierung, Sepsis, entzündlichen Gefäßerkrankungen (13)) beeinflusst werden, die bei der Interpretation der vWF-Werte bedacht werden müssen. Erhöhte vWF-Werte geben somit nicht zwingend nur die basale Endothelfunktion wieder.

V.2. Diskussion der Ergebnisse

V.2.1. Vergleich eingeschränkte versus gute flussmedierte Vasodilatation bei Normoalbuminurie

Die vorliegende Studie zeigt, dass noch keine signifikanten Unterschiede in der renalen Albuminausscheidung vorhanden waren, obwohl schon gravierende Störungen der endothelialen Stickoxidproduktion der A. brachialis vorlagen. So konnte bei 50% der Nicht-Diabetiker und bei 46% der Typ-2-Diabetiker eine eingeschränkt flussvermittelte Vasodilatation der A.brachialis im Sinne einer gestörten NO-Produktion nachgewiesen werden. Jedoch hatten insgesamt nur ca. 11% der Probanden aus beiden Gruppen mit gestörter flussmediierter Vasodilatation auch eine Mikroalbuminurie.

Eine Antwort auf die Frage, ob und in welcher zeitlichen Abfolge eine Mikroalbuminurie in dem bisher normoalbuminurischen Kollektiv mit schon gestörter Vasodilatation auftreten würde, wäre mit Sicherheit interessant. Longitudinale Schlüsse können allerdings aus den vorliegenden Daten nicht gezogen werden.

Bezüglich normoalbuminurischer Kollektive gibt es bislang wenige Referenzstudien. So untersuchten Lekakis et al. junge Typ-1-Diabetiker mit und ohne Mikroalbuminurie und kamen zu dem gleichen Ergebnis wie unsere Untersuchung (94). Auch in dieser Studie fanden sich Patienten mit bereits gestörter endothelabhängiger Vasodilatation bei noch normaler renaler Albuminausscheidung.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die alleinige Erhebung der renalen Albuminausscheidung möglicherweise erst zu spät auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hinweist. Die Messung der flussmedierten Vasodilatation mittels Ultraschall scheint daher ein sensitiveres Verfahren darzustellen, welches schon vor Störung der glomerulären Endothelfunktion den Beweis einer beginnenden systemischen Endothelialen Dysfunktion erbringen kann.

V.2.2. Vergleich Mikroalbuminurie versus Normoalbuminurie

Des Weiteren zeigt die vorliegende Studie, dass beim Vergleich der normoalbuminurischen Probanden mit den mikroalbuminurischen Probanden kein relevanter Unterschied in der endothelabhängigen Vasodilatation bestand. Es konnte somit keine Korrelation zwischen der flussmedierten Vasodilatation und der renalen Albuminexkretion gefunden werden.

Dieses Ergebnis wird auch durch die Studie von Meeking et al. bestätigt (104). Meeking et al. versuchten die Frage zu klären, ob Typ-1-Diabetiker mit Mikroalbuminurie eine schlechtere Endothelfunktion aufweisen als Patienten ohne Mikroalbuminurie. Auch sie fanden keinen signifikanten Unterschied der FMD-Werte zwischen der mikroalbuminurischen Gruppe und der normoalbuminurischen Gruppe ($p = 0.45$); lediglich fielen deutlich höhere Gesamt-Cholesterinwerte in der mikroalbuminurischen Gruppe auf ($p < 0.05$) (105).

Bezüglich der Korrelation zwischen FMD und Mikroalbuminurie kamen auch Diercks et al. in ihrer kürzlich veröffentlichten Studie zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie untersuchten über 650 Gesunde, nicht diabetische, nach neueren Kriterien nur leicht hypertensive ($RR < 160/100\text{mmHg}$) Probanden mit Mikroalbuminurie und fanden dabei keine Korrelation zwischen steigenden renalen Albuminausscheidungsraten und der flussmedierten ($r = -0.01$; $p = 0.8$) bzw. nitroglycerininduzierten Vasodilatation (49). Allerdings bemerkten sie, dass höhere renale Albuminausscheidungsraten mit zunehmend mehr kardiovaskulären Risikofaktoren einhergingen. So fanden sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der renalen Albuminausscheidung und dem systolischen bzw. diastolischen Blutdruck, dem Body-Mass-Index (Durchschnitts-BMI $26 \pm 4,2$) und den Triglyceridkonzentrationen im Serum.

Auch in unserer Studie kam der erhebliche Einfluss der Blutdruckwerte auf die renale Albuminexkretion zum Ausdruck. In der diabetischen und nicht-diabetischen Gruppe waren bei Probanden mit Normoalbuminurie die gemessenen Blutdruckwerte fast identisch.

Beim Vergleich der Probanden mit versus ohne Mikroalbuminurie ließen sich dagegen insbesondere bei der nicht-diabetischen Gruppe signifikante Unterschiede des mittleren systolischen ($p = 0.05$) sowie diastolischen Blutdruckes ($p < 0.05$) nachweisen. Ebenfalls fand sich ein deutlich erhöhter Body-Mass-Index bei den mikroalbuminurischen Nicht-Diabetikern im Vergleich zur normoalbuminurischen Gruppe ($p < 0.001$).

Aus den vorgestellten Ergebnissen geht hervor, dass die Mikroalbuminurie einen Indikator für vorliegende kardiovaskuläre Risikofaktoren darstellen kann, allerdings nicht zwingend muss. Somit weist sie möglicherweise erst auf eine chronische und damit auch morphologische Schädigung des Endothels hin. Die vorliegende Studie zeigt zudem, dass kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen einer gestörten flussmedierten Vasodilatation und erhöhten Albuminexkretionswerten bestehen kann, da bei insgesamt 7 der diabetischen und nicht-diabetischen Probanden eine pathologisch erhöhte Albuminausscheidung bestand, jedoch keine Störung der flussmedierten Vasodilatation nachweisbar war. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, dass eine sonographisch ermittelbare funktionelle Endothelschädigung zwingend zeitlich vor einer erhöhten renalen Albuminexkretion auftreten muss.

Im Gegensatz zu den vorangehend erläuterten Studienergebnissen steht die kürzlich veröffentlichte Studie von Clausen et al. (29). Hier wurde ein zu unserem Studienkollektiv vergleichbares Probandenkollektiv (41 normoalbuminurische Probanden und 19 Probanden mit einer Albuminurie bis $150\mu\text{g}/\text{min}$) auf den Zusammenhang zwischen einer nur leicht erhöhten Albuminausscheidung ($> 6\mu\text{g}/\text{min}$) und einer gestörten flussmedierten Vasodilatation der A. brachialis untersucht (30).

Dabei wurde vordergründig ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer verschlechterten FMD (endothelabhängige Vasodilatation) und GTN (endothelunabhängige Vasodilatation) und einer nur leicht erhöhten Albuminausscheidung postuliert.

Damit wäre prinzipiell die alleinige Messung der Albuminausscheidung für die Definition einer kardiovaskulären Hochrisikogruppe ausreichend gewesen. Jedoch wurde bei genauer Betrachtung dieser Studie evident, dass die Gruppe mit leicht erhöhter Albuminausscheidung auch erhöhte systolische Blutdruckwerte aufwies. Bei der multifaktoriellen Analyse dieser Daten zeigte sich dann auch, dass unter Einschluss der systolischen Blutdruckwerte der zuvor beschriebene Zusammenhang nicht mehr signifikant war (31).

Die Studiengruppe von Elliott et al. untersuchte mittels Venenverschluss-Plethysmographie, ob sich die vasokonstriktorische Reaktion auf N^G-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA), einem NO-Synthase Hemmer, zwischen Typ-1-Diabetikern mit bzw. ohne Mikroalbuminurie und gesunden Kontrollpersonen unterscheidet (54).

L-NMMA reduzierte hierbei sowohl bei den Gesunden, als auch den Diabetikern ohne Mikroalbuminurie die Carbacholreaktion ($p= 0.011$ bzw. $p= 0.006$), jedoch nicht bei den mikroalbuminurischen Diabetikern ($p= 0.330$).

Hier ergab die multivariate Analyse keinen Einfluss der Blutdruckwerte oder der Plasmafettwerte auf dieses Ergebnis (55).

Ein möglicher Grund für dieses diskrepante Ergebnis könnte darin bestehen, dass bei dieser Studie ein anderer Gefäßabschnitt (Mikrozirkulation) untersucht wurde. Arteriolen Widerstandsgefäße verändern den Blutfluss und können damit zu Volumenschwankungen in den Extremitäten führen. Diese Volumenschwankungen sind mit Hilfe der Venenverschluss-Plethysmographie messbar (23). Dieses Verfahren kann eine Aussage über die Reaktivität der kleinen Widerstandsgefäße machen, jedoch nicht über die Physiologie der größeren (Leitungs-)Gefäße, welche insbesondere zu arteriosklerotischen Läsionen neigen.

Poredos et al. (121) untersuchte deshalb in einem Studienkollektiv von 28 Typ-1-Diabetikern mit und ohne Mikroalbuminurie (14 Frauen/Männer, Mittleres Alter 29 ± 5 , RR $< 150/90$ mmHg, Nichtraucher, 9/28 diabetischen Probanden mit MA 33 ± 12 $\mu\text{g}/\text{min}$) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen den Gefäßdurchmesser von „Leitungsgefäßen“.

Hierbei konnte er bei den normoalbuminurischen diabetischen Probanden keinen signifikanten Unterschied der Endothelfunktion im Vergleich zu den normoalbuminurischen nicht-diabetischen Probanden finden, wohingegen er einen signifikanten Zusammenhang zwischen Endothelialer Dysfunktion und renaler Albuminausscheidung bei den 8 mikroalbuminurischen Diabetikern feststellte.

Zwar waren die systolischen Blutdruckwerte zwischen der diabetischen Gruppe und der nicht-diabetischen Gruppe vergleichbar (119 ± 9 vs. 119 ± 10 [mmHg] systolisch), jedoch machen Poredos et al. keine Aussage über einen direkten Vergleich zwischen normo- und mikroalbuminurischen Diabetikern in Bezug auf Blutdruck, Lipidprofil und weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Eine gestörte flussmedierte Vasodilatation fand sich auch beim Vergleich von mikroalbuminurischen Typ-1-Diabetikern mit normoalbuminurischen Diabetikern ($p < 0.01$) in einer ähnlichen Studie von Dogra et al. (50), wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede der Blutdruck- und Lipidwerte vorlagen.

Interessanterweise und entgegen anderen Studienergebnissen bestand jedoch hier kein Unterschied der vWF-Konzentrationen beim Vergleich der Gruppen.

Die Diskrepanz der Ergebnisse lässt erkennen, dass die Sensitivität der einzelnen Partialfunktionsmarker und deren zeitliches Auftreten noch längst nicht eindeutig geklärt sind. Bis weitere Studienergebnisse in diesem Bereich vorliegen, ist es wichtig, den globalen Begriff der Endothelialen Dysfunktion nur mit Vorsicht stellvertretend für eine der untersuchten endothelialen Partialfunktionsstörungen zu verwenden.

V.2.3. vWF und Mikroalbuminurie/ flussmedierte Vasodilatation

Eine Mikroalbuminurie wurde unter anderem auch deshalb als Marker einer Endothelialen Dysfunktion vorgeschlagen, da sie mit einigen Parametern der Endothelfunktion wie beispielsweise dem von-Willebrand-Factor (vWF) in Zusammenhang zu stehen scheint.

- **Korrelation zwischen dem von-Willebrand-Faktor und der renalen Albuminausscheidung**

Tatsächlich fand sich in der vorliegenden Studie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der vWF-Konzentration im Plasma und der renalen Albuminausscheidung (Spearman, $r = 0.39$; $p < 0,5$).

Eine Reihe von Studien unterstützen diese Beobachtung (27;81;138;145;147;174). So entwickelte sich beispielsweise in einer prospektiven Studie von Stehouwer et al. eine Mikroalbuminurie zeitgleich mit ansteigenden vWF-Werten von 121% auf 203% bei Typ-1-Diabetikern (149) und von 116% auf 219% bei Typ-2-Diabetikern (146) (Normalwerte 50-150%). In einer weiteren Studie konnten Stehouwer et al. (144) zeigen, dass nach einer Nachbeobachtungsphase von mehr als 3 Jahren nur bei Typ-2-Diabetikern mit neu diagnostizierter Mikroalbuminurie auch die vWF-Werte angestiegen waren, wohingegen normoalbuminurische Typ-2-Diabetiker immer noch unveränderte vWF-Konzentrationen aufwiesen.

Viele Studiengruppen haben gezeigt, dass erhöhte vWF-Konzentrationen prognostisch für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko stehen (15;77;153) (143). Dennoch ist noch nicht klar, ob der prognostische Wert des vWF auf seine spezifische Funktion als Verstärker der Thrombozytenadhäsion und der Faktor VIII Verfügbarkeit zurückzuführen ist, oder ob er tatsächlich vor allem einen Indikator einer Endothelzellschädigung darstellt.

- **Korrelation zwischen dem von-Willebrand-Faktor und der flussmedierten Vasodilatation**

In unserer Studie fand sich zwar ein signifikanter Zusammenhang zwischen den vWF-Konzentrationen und dem Auftreten einer erhöhten renalen Albuminexkretion, jedoch korrelierten die vWF-Konzentrationen nicht mit der flussmedierten Vasodilatation (Spearman, $r = -0.09$; $p = 0.6$).

Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die Partialfunktion der Vasotonusregulation einen möglicherweise früheren Marker einer Gefäßstörung darstellt, als eine pathologisch erhöhte vWF-Konzentration bzw. renale Albuminausscheidung.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Ihlemann et al. (74) in ihrer kürzlich veröffentlichten Studie mit relativ jungen (mittleres Alter 47 ± 1.7), normoalbuminurischen Typ-2-Diabetikern, welche keine weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren aufwiesen (Nichtraucher, negative kardiovaskuläre Anamnese, normales EKG, mittlerer BMI 28 ± 2.7 , kein Insulin). Auch sie fanden keinen Zusammenhang zwischen den beiden Endothelparametern (FMD und vWF), weder in der normoalbuminurischen diabetischen Gruppe, noch in der gesunden Kontrollgruppe.

Sie postulierten, dass die mit Ultraschall ermittelte endogene, als auch exogene NO-Produktion bei Typ-2-Diabetikern schon frühzeitig gestört ist, wohingegen die vWF-Plasmakonzentration und die renale Albuminausscheidung zur selben Zeit noch normwertig sein können (75).

Damit unterstützen sie die Hypothese, dass die Partialfunktion der Vasotonusregulation einen sensitiveren und möglicherweise früheren Marker einer Gefäßstörung darstellt, als erhöhte vWF-Konzentrationen bzw. eine Mikroalbuminurie.

Auch Lim et al. unterstützen diese Theorie (98). So fanden sie bei (noch) normoalbuminurischen Typ-2-Diabetikern einerseits schon eine gestörte endothelabhängige als auch endothelunabhängige Vasodilatation, andererseits konnten erhöhte Plasma vWF-Konzentration nur bei Typ-2-Diabetikern mit Mikroalbuminurie nachgewiesen werden (97).

Bezüglich der daneben erhobenen Endothelfunktionsparameter kamen sie jedoch zu kontroversen Ergebnissen. So waren die Serum-Werte von sICAM (soluble intercellular adhesion molecule) und sVCAM (soluble vascular cell adhesion molecule) sowohl bei normo- als auch bei mikroalbuminurischen Typ-2-Diabetikern erhöht. Möglicherweise scheinen diese Parameter auch frühere Marker einer funktionellen Endothelzellstörung zu sein als die erhöhte renale Albuminausscheidung.

Die Hypothese, eine gestörte vaskuläre Reaktivität stelle einen sensitiveren Marker einer beginnenden Arteriosklerose dar als erhöhte vWF-Werte, wird auch durch Studien an gesunden, erstgradig mit Typ-2-Diabetikern verwandten Probanden unterstützt. Schon frühzeitig ließen sich in diesen Studien an prädiabetischen Kollektiven Störungen der endothelialen NO-Produktion aufzeigen (7), obwohl noch keine Veränderungen in der vWF-Konzentration vorlagen (60).

Bei Hypertoniepatienten zeigte sich - im Gegensatz zu den vorangehenden Studien an diabetischen Kollektiven – in einer Studie von Felmeden et al. (59) eine signifikante Korrelation zwischen der flussmediierten Vasodilatation und den Plasmakonzentrationen des vWFs.

In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen der flussmedierten Vasodilatation und dem Plasma-vWF bei 43 Gesunden und 89 Hypertonikern (mittleres Alter 64 ± 8.4) untersucht. Zwischen den beiden unterschiedlichen Parametern konnte hier eine signifikante Korrelation im Gesamtkollektiv ($r = -0.517$, $p < 0.001$) festgestellt werden. Nach einer intensiven 6-monatigen antihypertensiven und lipidreduzierenden medikamentösen Behandlung und weiteren diätetischen Maßnahmen, konnte eine Besserung der vWF-Konzentrationen um 11%, der FMD-Werte um 50% gemessen werden.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse stellte sich jedoch heraus, dass alle hypertensiven Probanden mindestens noch drei weitere Risikofaktoren (Linksherzhypertrophie, EKG-Veränderungen, cerebrovaskuläre Events, männliches Geschlecht, Alter >55 Jahre, MA/Proteinurie, Rauchen, pAVK, Gesamt-Cholesterin/ HDL < 6) aufwiesen, welche bei fortgeschrittener Arteriosklerose zu finden sind.

Dies wäre ein möglicher Grund warum beide Endothelmarker (vWF und FMD) bei diesem hypertensiven Kollektiv schon pathologisch waren. Leider machen die Autoren keine weiteren Angaben in Bezug auf eine möglicherweise vorhandene Mikroalbuminurie als weiteren Endothelfunktionsmarker.

VI. Limitation und Ausblick

Aufgrund unserer Ergebnisse und der aufgeführten Studienlage wird klar, dass alle hier diskutierten Methoden unterschiedliche Partialfunktionsstörungen der Gefäßwand erfassen und sich somit kardiovaskuläre Hochrisikogruppen nicht anhand der Mikroalbuminurie, des von-Willebrand-Faktors oder der mit Ultraschall erhobenen peripheren Endothelfunktion allein klassifizieren lassen. Da eine erhöhte renale Albuminausscheidung als Störung der Gefäßpermeabilität aufgefasst werden kann (43), zählt auch sie zu den Indikatoren einer gestörten Endothelfunktion (131). Dennoch darf bei Normoalbuminurie nicht automatisch von der Intaktheit und Funktionstüchtigkeit der Endothelzellen ausgegangen werden, da sich der globale Endothelstatus aus mehreren Partialfunktionen und deren Interaktion zusammensetzt. Möglicherweise ist eine Störung der postischämischen Vasodilatation als Ausdruck einer funktionellen Endothelstörung schon zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar als erhöhte renale Albuminausscheidungsraten bzw. erhöhte vWF-Konzentrationen, da diese Parameter eher auf eine morphologische und damit spätere Schädigung der Endothelzellen hinzuweisen scheinen.

Die vorliegende Arbeit bietet die Grundlage für weitere gezielte Longitudinalstudien. In diesen Längsschnittuntersuchungen, insbesondere interessant für prädiabetische Risikokollektive, könnte unter anderem die zeitliche Abfolge, in der die Endothelfunktionsparameter pathologisch werden, untersucht werden. Unter Umständen wäre dann eine Aussage über eine eventuelle Reihenfolge der Störungen der endothelialen Partialfunktionen möglich. Dies würde die Basis für eine effizientere Frühdiagnostik zur Identifizierung kardiovaskulärer Hochrisikogruppen bilden.

Bis weitere Studienergebnisse vorliegen und der ideale Parameter der Endothelfunktion gefunden ist, sollte im Sinne einer optimalen Frühdiagnostik kardiovaskulärer Risikogruppen (v.a. Diabetiker) bestmöglich schon vor der routinemäßigen Bestimmung der renalen Albuminausscheidung auch die periphere Endothelfunktion mittels Ultraschall erfasst werden.

VII. Zusammenfassung

Einleitung: Die aktuelle Atherosklerosetheorie sieht in Störungen der endothelialen NO-Produktion eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Thrombogenität der Gefäßwand und einen Triggermechanismus morphologischer Veränderungen im Prozess zur stenosierenden Plaque.

Entsprechend der bislang vorliegenden Studienlage kommt der Diagnostik einer gestörten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit eine relevante prognostische Bedeutung in der Primärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen zu. Die Erfassung einer gestörten NO-Produktion kann risikolos, nicht invasiv mit konventionellem hochauflösendem Ultraschall durchgeführt werden.

Gerade bei Diabetikern wird analog dazu einer vorliegenden Mikroalbuminurie ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Der Nachweis einer Mikroalbuminurie ist technisch einfach und damit als Screening-Untersuchung auch aus ökonomischer Sicht geeignet.

Unklar ist jedoch, ob der Nachweis einer Mikroalbuminurie als „Frühmarker“ einer gestörten Endothelfunktion angesehen werden kann, oder ob Störungen der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit auch unabhängig von einer pathologischen Albuminausscheidung vorliegen können.

Methodik: Untersucht wurden 129 Personen (56 Typ-2-Diabetiker und 73 Nicht-Diabetiker) auf den Zusammenhang von renaler Albuminausscheidung und gestörter endothelialer NO-Bioverfügbarkeit. Die Erfassung der NO-Bioverfügbarkeit erfolgte über die Messung der flussmedierten Vasodilatation der Arteria brachialis mittels hochauflösendem Ultraschall (13 MHz-Linearsonde). Verglichen wurden Probanden mit gestörter endothelialer NO-Produktion (FMD < 5%) versus normaler Vasotonusregulation (> 5%). In einer Subgruppe untersuchten wir zudem die Rolle des von-Willebrand-Faktor in diesem Zusammenhang.

Ergebnisse: Als zentrales Ergebnis zeigte sich, dass Störungen der NO-Bioverfügbarkeit bereits bei normaler Albuminausscheidung (< 20µg/min bzw. <

20 mg/l) sowohl in der diabetischen als auch in der nicht-diabetischen Gruppe nachweisbar waren (bei einer ansonsten ausgeglichenen Prävalenz weiterer Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms wie systolischer/ diastolischer Blutdruck, Glukosestoffwechsel, Lipidstatus).

Für die Gruppe der normoalbuminurischen Typ 2 Diabetiker (DM) lag die Albuminausscheidungsrate für Probanden mit gestörter FMD bei DM $4,8 \pm 5,5$ versus $4,6 \pm 5,1$ mg/l bei normaler FMD, für die Gruppe der Nicht-Diabetiker (NDM) bei $5,1 \pm 2,6$ vs. $4,9 \pm 2,7$ µg/min. Damit konnte auch kein gradueller Unterschied der Albuminausscheidungsraten innerhalb des Normbereichs nachgewiesen werden.

Ebenso zeigte der Vergleich der flussmedierten Vasodilatation (FMD) von Probanden mit bereits vorliegender Mikroalbuminurie (20 – 200 µg/min bzw. 20-200 mg/l, n=18) versus normoalbuminurischen Probanden (n=111) weder für die Gruppe der Diabetiker ((DM) FMD $4,3 \pm 1,8$ vs. $4,9 \pm 2,2$ %) noch für die Gruppe der Nicht-Diabetiker ((NDM) FMD $6,7 \pm 4,0$ vs. $6,4 \pm 5,5$ %) einen relevanten Unterschied. Allerdings zeigten sich hier die klassischen Risikofaktoren von relevantem Einfluss. So wiesen insbesondere in der Gruppe der Nicht-Diabetiker Probanden mit Mikroalbuminurie bereits höhere Blutdruckwerte ($p=0,05$) und einen höheren Body-Mass-Index ($p< 0,01$) auf.

Bei der Bestimmung des von-Willebrand-Faktors zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Grad der renalen Albuminausscheidung ($r=0.4$ und $p=0.47$), hingegen keine Korrelation zur flussmedierten Vasodilatation.

Diskussion: Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass alle Testverfahren (Bestimmung der Albuminausscheidung, endothelabhängige Vasodilatation und von-Willebrand-Faktor) voneinander unabhängige Störungen des Gefäßsystems erfassen. Weder kann bei Normoalbuminurie auf eine „normale Endothelfunktion“ noch bei Vorliegen einer erhöhten renalen Albuminausscheidung auf eine globale endotheliale Dysfunktion geschlossen werden. Vielmehr müssen bei Aussagen zur Endothelfunktion die unterschiedlichen Partialfunktionen getrennt voneinander betrachtet werden.

Schlussfolgerung: Als Konsequenz unserer Ergebnisse sollte im Sinne einer optimalen Frühdiagnostik zur Identifizierung kardiovaskulärer Hochrisikogruppen die Erfassung der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit mittels Ultraschall ergänzend und bestmöglich zusammen mit der renalen Albuminbestimmung durchgeführt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Reference List

- (1) Adler S, Radomski MW, Moncada S, Thews. Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5(5):1165-1172.
- (2) Balletshofer BM. Indikatoren einer beginnenden Atherosklerose. *Ultraschall in Med* 2003; 24:153-161.
- (3) Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M et al. [Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound]. *Ultraschall Med* 2001; 22(5):231-235.
- (4) Balletshofer BM, Haring HU, Thews. Type 2-diabetes, insulin resistance and endothelial dysfunction. *Hämostaseologie* 2001; 21:159-166.
- (5) Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101(15):1780-1784.
- (6) Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101(15):1780-1784.
- (7) Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101(15):1780-1784.
- (8) Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101(15):1780-1784.
- (9) Baron AD, Thews. The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium-derived nitric oxide. *Diabetes* 1996; 45 Suppl 1:S105-S109.
- (10) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA, Thews. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(4):1620-1624.

- (11) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA, Thews. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(4):1620-1624.
- (12) Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP, Thews. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998; 37(3):586-600.
- (13) Blann AD. von Willebrand factor and atherosclerosis. *J Intern Med* 1995; 237(4):432-434.
- (14) Blann AD, Amiral J, McCollum CN. Prognostic value of increased soluble thrombomodulin and increased soluble E-selectin in ischaemic heart disease. *Eur J Haematol* 1997; 59(2):115-120.
- (15) Blann AD, Waite MA. von Willebrand factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in predicting the progression of atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 1996; 7(2):143-147.
- (16) Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2):168-175.
- (17) Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2):168-175.
- (18) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347(6295):768-770.
- (19) Brenner B. Effect of Ca²⁺ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(9):3265-3269.
- (20) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318(20):1315-1321.
- (21) Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87(2):432-438.
- (22) Bürrig KF. Endothel und lokale Faktoren beim Werdegang der Arteriosklerose, 68-73 in Doerr, W., Leonhardt, H.: Normale und pathologische Anatomie; Band 53, Georg Thieme, Stuttgart, New York. Doerr W, Leonhardt H, editors. Normale und pathologische Anatomie. 53, 68-73. 1993. Georg Thieme .
- (23) Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992; 90(6):2548-2554.

- (24) Castillo C, Bogardus C, Bergman R, Thuillez P, Lillioja S. Interstitial insulin concentrations determine glucose uptake rates but not insulin resistance in lean and obese men. *J Clin Invest* 1994; 93(1):10-16.
- (25) Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(5):753-759.
- (26) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828):1111-1115.
- (27) Chen JW, Gall MA, Deckert M, Jensen JS, Parving HH. Increased serum concentration of von Willebrand factor in non-insulin dependent diabetic patients with and without diabetic nephropathy. *BMJ* 1995; 311(7017):1405-1406.
- (28) Christensen CK. Abnormal albuminuria and blood pressure rise in incipient diabetic nephropathy induced by exercise. *Kidney Int* 1984; 25(5):819-823.
- (29) Clausen P, Jensen JS, Jensen G, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B. Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinically healthy subjects. *Circulation* 2001; 103(14):1869-1874.
- (30) Clausen P, Jensen JS, Jensen G, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B. Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinically healthy subjects. *Circulation* 2001; 103(14):1869-1874.
- (31) Clausen P, Jensen JS, Jensen G, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B. Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinically healthy subjects. *Circulation* 2001; 103(14):1869-1874.
- (32) Connell SJ, Hollis S, Tieszen KL, McMurray JR, Dornan TL. Gender and the clinical usefulness of the albumin: creatinine ratio. *Diabet Med* 1994; 11(1):32-36.
- (33) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88(5):1663-1671.
- (34) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88(5):1663-1671.
- (35) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88(5):1663-1671.

-
- (36) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):257-265.
- (37) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):257-265.
- (38) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):257-265.
- (39) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):257-265.
- (40) Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79(5):984-991.
- (41) Cross JM, Donald A, Vallance PJ, Deanfield JE, Woolfson RG, MacAllister RJ. Dialysis improves endothelial function in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(9):1823-1829.
- (42) Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Iribarra V, Mizon C, San Martin A et al. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* 2000; 35(2):143-148.
- (43) Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 15(9):1181-1191.
- (44) Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 15(9):1181-1191.
- (45) Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 15(9):1181-1191.

- (46) Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 15(9):1181-1191.
- (47) Deckert T, Yokoyama H, Mathiesen E, Ronn B, Jensen T, Feldt-Rasmussen B et al. Cohort study of predictive value of urinary albumin excretion for atherosclerotic vascular disease in patients with insulin dependent diabetes. *BMJ* 1996; 312(7035):871-874.
- (48) DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14(3):173-194.
- (49) Diercks GF, Stroes ES, van Boven AJ, van Roon AM, Hillege HL, De Jong PE et al. Urinary albumin excretion is related to cardiovascular risk indicators, not to flow-mediated vasodilation, in apparently healthy subjects. *Atherosclerosis* 2002; 163(1):121-126.
- (50) Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia* 2001; 44(5):593-601.
- (51) Duffy SJ, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney JF, Jr. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(6):1084-1089.
- (52) El Mabrouk M, Singh A, Touyz RM, Schiffrin EL. Antiproliferative effect of L-NAME on rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2000; 67(13):1613-1623.
- (53) Elherik K, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JJ. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102(5):547-552.
- (54) Elliott TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci (Lond)* 1993; 85(6):687-693.
- (55) Elliott TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci (Lond)* 1993; 85(6):687-693.
- (56) Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haering HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 1998; 21(2):271-277.
- (57) Feldt-Rasmussen B JJB-JK. The kidney and hypertension in diabetes mellitus. London: 1996.

- (58) Feldt-Rasmussen B. Increased transcapillary escape rate of albumin in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia* 1986; 29(5):282-286.
- (59) Felmeden DC, Blann AD, Spencer CG, Beevers DG, Lip GY. A comparison of flow-mediated dilatation and von Willebrand factor as markers of endothelial cell function in health and in hypertension: relationship to cardiovascular risk and effects of treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14(5):425-431.
- (60) Fernandez-Castaner M, Camps I, Fernandez-Real JM, Domenech P, Martinez-Brotons F. Increased prothrombin fragment 1 + 2 and D-dimer in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. Prethrombotic state in relatives of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol* 1996; 33(2):118-121.
- (61) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789):373-376.
- (62) Garg JP, Bakris GL. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. *Vasc Med* 2002; 7(1):35-43.
- (63) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1774-1777.
- (64) Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng HM, Chylack LT, Jr. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* 1984; 33(2):196-199.
- (65) Griffith T. Endothelium-derived relaxing factor and the control of flow in conduit and resistance arteries. In: Bevan JAKGRGM, editor. *Flow -dependent regulation of vascular function*. Oxford: American Physiological Society, 1995: 178-213.
- (66) Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86(9):E85-E90.
- (67) Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339(4):229-234.
- (68) Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992; 41(6):715-722.

- (69) Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992; 41(6):715-722.
- (70) Hanefeld M. Das metabolische Syndrom. *Dtsch Gesundheitswesen* 1980;(36):715-722.
- (71) Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92(12):3431-3435.
- (72) Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92(12):3431-3435.
- (73) Hawthorne GC, Bartlett K, Hetherington CS, Alberti KG. The effect of high glucose on polyol pathway activity and myoinositol metabolism in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* 1989; 32(3):163-166.
- (74) Ihlemann N, Stokholm KH, Eskildsen PC. Impaired vascular reactivity is present despite normal levels of von Willebrand factor in patients with uncomplicated Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19(6):476-481.
- (75) Ihlemann N, Stokholm KH, Eskildsen PC. Impaired vascular reactivity is present despite normal levels of von Willebrand factor in patients with uncomplicated Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19(6):476-481.
- (76) Informationelle Gesundheitsversorgung. 2002. Statistisches Bundesamt.
- (77) Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(12):3071-3078.
- (78) Jarrett RJ, Viberti GC, Argyropoulos A, Hill RD, Mahmud U, Murrells TJ. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin-dependent diabetics. *Diabet Med* 1984; 1(1):17-19.
- (79) Jensen T, Bjerre-Knudsen J, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; 1(8636):461-463.
- (80) Jensen T, Bjerre-Knudsen J, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; 1(8636):461-463.
- (81) Jensen T, Bjerre-Knudsen J, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; 1(8636):461-463.

- (82) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91(5):1314-1319.
- (83) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91(5):1314-1319.
- (84) Johns A, Freay AD, Adams DJ, Lategan TW, Ryan US, van Breemen C. Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 Suppl 5:S119-S123.
- (85) Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88(6):2510-2516.
- (86) Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989; 149(7):1514-1520.
- (87) Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(1):146-154.
- (88) Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(1):146-154.
- (89) Knudsen HL, Frangos JA. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 2):H347-H355.
- (90) Landgraf-Leurs MM, Modi E, Horn K, Landgraf R. Immunoturbidimetric assay for the determination of microalbuminuria using the Hitachi analyser. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25(10):683-687.
- (91) Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(13):5141-5145.
- (92) Leiper JM, Santa MJ, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343 Pt 1:209-214.
- (93) Leiper JM, Santa MJ, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343 Pt 1:209-214.

- (94) Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res* 1997; 34(1):164-168.
- (95) Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res* 1997; 34(1):164-168.
- (96) Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res* 1997; 34(1):164-168.
- (97) Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* 1999; 22(11):1865-1870.
- (98) Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* 1999; 22(11):1865-1870.
- (99) Makimattila S, Virkamaki A, Groop PH, Cockcroft J, Utriainen T, Fagerudd J et al. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1996; 94(6):1276-1282.
- (100) Mannucci PM. Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;(92):2428-2432.
- (101) Mannucci PM. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(9):1359-1362.
- (102) Mannucci PM. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(9):1359-1362.
- (103) McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35(8):771-776.
- (104) Meeking DR, Cummings MH, Thorne S, Donald A, Clarkson P, Crook JR et al. Endothelial dysfunction in Type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *Diabet Med* 1999; 16(10):841-847.

- (105) Meeking DR, Cummings MH, Thorne S, Donald A, Clarkson P, Crook JR et al. Endothelial dysfunction in Type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *Diabet Med* 1999; 16(10):841-847.
- (106) Mehnert H. SEUKH. *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 4 ed. Stuttgart, New York: Thieme, 1999.
- (107) Mehnert H. Pathogenese und Diagnostik. In: Mehnert H, editor. *Typ 2-Diabetes*. Medikon Verlag, 2002: 17.
- (108) Mehnert H, Kuhlmann H. [Hypertension and diabetes mellitus]. *Dtsch Med J* 1968; 19(16):567-571.
- (109) Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99(9):1141-1146.
- (110) Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310(6):356-360.
- (111) Mogensen CE, Vestbo E, Poulsen PL, Christiansen C, Damsgaard EM, Eiskjaer H et al. Microalbuminuria and potential confounders. A review and some observations on variability of urinary albumin excretion. *Diabetes Care* 1995; 18(4):572-581.
- (112) Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145(3):201-227.
- (113) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27):2002-2012.
- (114) Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res* 1997; 80(3):320-326.
- (115) Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):251-256.
- (116) Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 331(6152):168-170.
- (117) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524-526.
- (118) Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997; 46 Suppl 2:S9-13.

- (119) Pinto-Sietsma SJ, Janssen WM, Hillege HL, Navis G, De Zeeuw D, De Jong PE. Urinary albumin excretion is associated with renal functional abnormalities in a nondiabetic population. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(10):1882-1888.
- (120) Poortmans JR. Postexercise proteinuria in humans. Facts and mechanisms. *JAMA* 1985; 253(2):236-240.
- (121) Poredos P, Kek A. Relation of blunted dilation of the brachial artery in insulin-dependent diabetes mellitus to microalbuminuria. *Am J Cardiol* 2000; 86(3):364-367.
- (122) Pottinger BE, Read RC, Paleolog EM, Higgins PG, Pearson JD. von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 1989; 53(4):387-394.
- (123) Radomski MW, Moncada S. Biological role of nitric oxide in platelet function. In: Moncada S, Higgs S, Berrazueta J, editors. *Clinical relevance of nitric oxide in the Cardiovascular system*. Madrid: EDICOMPLET, 1991: 45-56.
- (124) Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37(12):1595-1607.
- (125) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101(3):746-752.
- (126) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101(3):746-752.
- (127) Roessner A. Grundlagen in der Pathologie des Kreislaufes, Kapitel 9.1, 195-199 in Grundmann, E: *Einführung in die allgemeine Pathologie*; Auflage G, Fischer, Stuttgart, New York. G ed. Stuttgart, New York: Fischer, 1994.
- (128) Rosenzweig LJ, Kanwar YS. Removal of sulfated (heparan sulfate) or nonsulfated (hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to ¹²⁵I-bovine serum albumin. *Lab Invest* 1982; 47(2):177-184.
- (129) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986; 314(8):488-500.
- (130) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423):801-809.
- (131) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-126.

- (132) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-126.
- (133) Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86(3):675-684.
- (134) Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180(93):1332-1339.
- (135) Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 4:S1-14.
- (136) Salomone OA, Elliott PM, Calvino R, Holt D, Kaski JC. Plasma immunoreactive endothelin concentration correlates with severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris and normal ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(1):14-19.
- (137) Schmidt, Thews. *Physiologie des Menschen*. 26 ed. Springer Verlag Stuttgart, 2003.
- (138) Schmitz A, Ingerslev J. Haemostatic measures in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabet Med* 1990; 7(6):521-525.
- (139) Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE. Attenuated fibrinolysis and accelerated atherogenesis in type II diabetic patients. *Diabetes* 1993; 42(1):1-7.
- (140) Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. *Circulation* 1995; 91(1):248-250.
- (141) Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267(22):15274-15276.
- (142) Squadrito GL, Pryor WA. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 1995; 96(2):203-206.
- (143) Standl E, Balletshofer B, Dahl B, Weichenhain B, Stiegler H, Hormann A et al. Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM: the Munich General Practitioner Project. *Diabetologia* 1996; 39(12):1540-1545.
- (144) Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW, Polak BC, Donker AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995; 44(5):561-564.
- (145) Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW, Polak BC, Donker AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995; 44(5):561-564.

- (146) Stehouwer CD, Nauta JJ, Zeldenrust GC, Hackeng WH, Donker AJ, den Ottolander GJ. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340(8815):319-323.
- (147) Stehouwer CD, Nauta JJ, Zeldenrust GC, Hackeng WH, Donker AJ, den Ottolander GJ. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340(8815):319-323.
- (148) Stehouwer CD, Nauta JJ, Zeldenrust GC, Hackeng WH, Donker AJ, den Ottolander GJ. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340(8815):319-323.
- (149) Stehouwer CD, Stroes ES, Hackeng WH, Mulder PG, den Ottolander GJ. von Willebrand factor and development of diabetic nephropathy in IDDM. *Diabetes* 1991; 40(8):971-976.
- (150) Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8(11):1211-1217.
- (151) Tagle R, Acevedo M, Vidt DG. Microalbuminuria: is it a valid predictor of cardiovascular risk? *Cleve Clin J Med* 2003; 70(3):255-261.
- (152) Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S et al. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* 1996; 45 Suppl 3:S81-S83.
- (153) Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995; 332(10):635-641.
- (154) Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6):H2484-H2488.
- (155) Tiefenbacher CP, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kubler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102(18):2172-2179.
- (156) Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89(5):2176-2182.
- (157) Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358(9299):2127-2128.

- (158) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2(8670):997-1000.
- (159) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2(8670):997-1000.
- (160) van den BJ, Berden JH. Is microalbuminuria in diabetes due to changes in glomerular heparan sulphate? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(8):1277-1279.
- (161) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323(1):27-36.
- (162) Vernier RL, Steffes MW, Sisson-Ross S, Mauer SM. Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41(4):1070-1080.
- (163) Vittinghus E, Mogensen CE. Graded exercise and protein excretion in diabetic man and the effect of insulin treatment. *Kidney Int* 1982; 21(5):725-729.
- (164) Volk A, Renn W, Overkamp D, Mehnert B, Maerker E, Jacob S et al. Insulin action and secretion in healthy, glucose tolerant first degree relatives of patients with type 2 diabetes mellitus. Influence of body weight. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107(2):140-147.
- (165) Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 Suppl 5:S115-S118.
- (166) Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Haring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 2002; 45(6):890-898.
- (167) Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Haring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 2002; 45(6):890-898.
- (168) Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol* 1991; 11(6):565-577.
- (169) Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S et al. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res* 1993; 73(6):1121-1127.
- (170) Williams B, Schrier RW. Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1992; 41(11):1464-1472.

- (171) Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(3):567-574.
- (172) Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest* 1991; 87(1):31-38.
- (173) Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. Islington Diabetes Survey. *Lancet* 1988; 2(8610):530-533.
- (174) Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care* 1995; 18(7):975-982.

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H.-U. Häring

für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas.

Herrn Oberarzt Dr. B.-M. Balletshofer

für die engagierte und humorvolle Betreuung
und kritische Durchsicht der gesamten Arbeit.

Frau Dr. S. Goebbel

für die Hilfe bei der Zusammenführung unzähliger Probandendaten.

Frau Dr. A. Lehn-Stefan

für die Einarbeitung in die Endothelfunktionsmessung mittels Ultraschall.

Herrn Dr. K. Rittig

für viele kleine Hilfestellungen und aufbauende Worte.

Anne Thämer und meinen Eltern

für die Korrektur und konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Johannes Böer

für die ermutigende und liebevolle Begleitung bei der Entstehung dieser Arbeit
und die stete Erinnerung an ein Leben neben der Medizin.

X. Lebenslauf

Name, Vorname: Braun, Bettina Karen
Geburtsdatum: 22.01.1979
Geburtsort: Rüsselsheim
Eltern: Dagmar Braun, geb. Zincke
Prof. Dr. med. Bernd Braun

Schulbildung: 1985-1989: Besuch der Freien evangelischen Schule in Reutlingen
1989-1998: Besuch des Isolde-Kurz-Gymnasiums in Reutlingen
1998: Abitur

Studium: WS 98/99: Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls-Universität Tübingen
28.08.2000: Physikum
28.08.2001: Erstes Staatsexamen
WS 02/03: Studium der Humanmedizin an der Brown University in Providence, Rhode Island
06.04.2004: Zweites Staatsexamen
26.04.2005: Drittes Staatsexamen

Famulaturen: BG Unfallklinik Tübingen (Unfallchirurgie)
Bürgerhospital Stuttgart (Innere Medizin)
Centre Hospitalier de Libreville, Gabun (Pädiatrie)
Rhode Island Hospital, USA (Neurologie)
Memorial Hospital Pawtucket, USA (Innere Medizin)
Marienhospital Stuttgart (Gynäkologie)

Praktisches Jahr: Gynäkologie am Städtischen Krankenhaus Esslingen
Chirurgie am Kantonsspital Winterthur (Schweiz)
Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus Esslingen