

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Der Einfluss der Insulintherapie auf Inflammations- und  
endotheliale Marker der Atherosklerose sowie auf  
Gerinnungsfaktoren und Marker der Fibrinolyse bei Patienten mit  
Diabetes mellitus Typ 2**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Khan Makui

aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. von Schacky

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. C. Schäfer  
Prof. Dr. med. H.M. Schmetzer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. G. Meier

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2008

1. Einleitung.....	6
1.1. Allgemein .....	6
1.2. Atherosklerose, Inflammation und endotheliale Dysfunktion.....	7
1.3. Diabetes mellitus und Atherosklerose .....	12
1.4. Inflammationsmarker der Atherosklerose.....	15
1.4.1. Inflammationsmarker .....	15
1.4.2. Endotheliale Marker.....	18
1.4.3. Hämostaseologie, Gerinnungsfaktoren und Marker der .....	23
Fibrinolyse .....	23
1.5. Insulin: pro- oder antiinflammatorisch ? .....	27
1.6. Die Rolle der Insulintherapie bei Patienten mit Typ-2-Diabetes .....	29
1.7. Fragestellungen .....	32
2. Material und Methoden .....	33
2.1. Patientenkollektiv .....	33
2.2. Studiendesign .....	34
2.3. Analytische Methoden.....	36
2.3.1. Blutentnahme und Probenaufbereitung .....	36
2.3.2. hs-CRP .....	36
2.3.3. IL-6 .....	37
2.3.4. MMP-9, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin .....	37
2.3.5. C-Peptid .....	38
2.3.6. HbA1C.....	39
2.3.7. Gesamt-Cholesterin.....	40
2.3.8. HDL - Cholesterin .....	40
2.3.9. LDL-Cholesterin.....	41
2.3.10. Triglyzeride .....	41
2.3.11. Blutglukose .....	41
2.3.12. Kreatinin .....	42
2.3.13. Albumin .....	42
2.3.14. Lipoprotein (a) .....	42
2.3.15. Fibrinogen.....	42
2.3.16. D- Dimer .....	43
2.3.17. Faktor VII.....	43
2.3.18. Faktor VIII .....	43
2.3.19. Homocystein.....	44
2.3.20. PAI-1 .....	44
2.4. Statistik .....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. Patienten.....	46
3.2. Stoffwechselfparameter .....	49
3.3. Inflammationsparameter .....	51
3.4. Endotheliale Marker .....	53
3.4.1. MMP-9 .....	53
3.4.2. MCP-1 .....	54
3.4.3. ICAM-1 .....	54
3.4.4. VCAM-1 .....	54

3.4.5. E-Selectin .....	54
3.5. Gerinnungsparameter .....	55
3.5.1. Fibrinogen.....	55
3.5.2. Faktor VII.....	55
3.5.3. Faktor VIII.....	56
3.5.4. D-Dimer .....	56
3.5.5. PAI-1 .....	56
4. Diskussion .....	57
4.1. Sind inflammatorische Biomarker bei Patienten mit Typ-2- Diabetes erhöht?.....	57
4.2. Der Einfluss einer Insulintherapie auf Inflammationsmarker der Atherosklerose .....	60
4.2.1. hs-CRP .....	61
4.2.2. Lp(a) .....	63
4.2.3. Endotheliale Marker (E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, MMP-9).....	64
4.3. Der Einfluss einer Insulintherapie auf Gerinnungsfaktoren und Marker der Fibrinolyse .....	65
4.4. Limitationen des Studiendesigns.....	67
4.5. Diskussion der Ergebnisse.....	67
5. Zusammenfassung .....	70
6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Abkürzungsverzeichnis.....	92
8. Danksagung .....	94
9. Lebenslauf .....	95

Meinem Vater

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemein

Die Prävalenz des Diabetes mellitus ist in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen. Einer Hochrechnung entsprechend ist weltweit bis zum Jahr 2025 mit einer Verdoppelung der Zahl der Diabetiker zu rechnen, wobei die Entwicklungsländer die stärkste Zunahme verzeichnen werden (King 1998). Im Jahr 2025 würden demnach 5-6 % der Weltbevölkerung (ca. 300 Millionen Menschen) von Diabetes mellitus betroffen sein. In Deutschland liegt die Prävalenz des bekannten Diabetes bei 5-9 % mit steigender Tendenz, was bedeutet, daß ca. 4-7 Millionen Patienten wegen eines Diabetes mellitus behandelt werden. Dabei ist eine hohe Dunkelziffer zu berücksichtigen (Hauner 2003). Das Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit erhöht sich bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 auf das 2- bis 4fache gegenüber der Normalbevölkerung. Typ-2-Diabetiker sterben in bis zu 80 % der Fälle an Gefäßkomplikationen, von denen 75 % der Todesfälle durch Komplikationen der koronaren Herzkrankheit (KHK) bedingt sind (Sixt 2004).

Die Atherosklerose steht als Todesursache in den westlichen Ländern an erster Stelle (Ross 1999).

Weitere klinische Folgen der Atherosklerose sind Myokardinfarkt, zerebrale Durchblutungsstörungen und chronische periphere Verschlusskrankheit (pAVK). Pathologische und angiographische Studien haben gezeigt, dass sich der Diabetes durch eine diffuse und akzelerierte Form der Atherosklerose auszeichnet. Diabetiker weisen mehr komplexere Plaques auf, die häufiger Folgeprobleme mit sich bringen. Angiographische Untersuchungen bei Diabetikern mit instabiler Angina pectoris zeigten eine höhere Inzidenz von Plaqueulzerationen und Thrombenbildung. Diese Plaques waren auch lipidreicher mit zahlreichen Komponenten einer Entzündung (Moreno 2000).

## **1.2. Atherosklerose, Inflammation und endotheliale Dysfunktion**

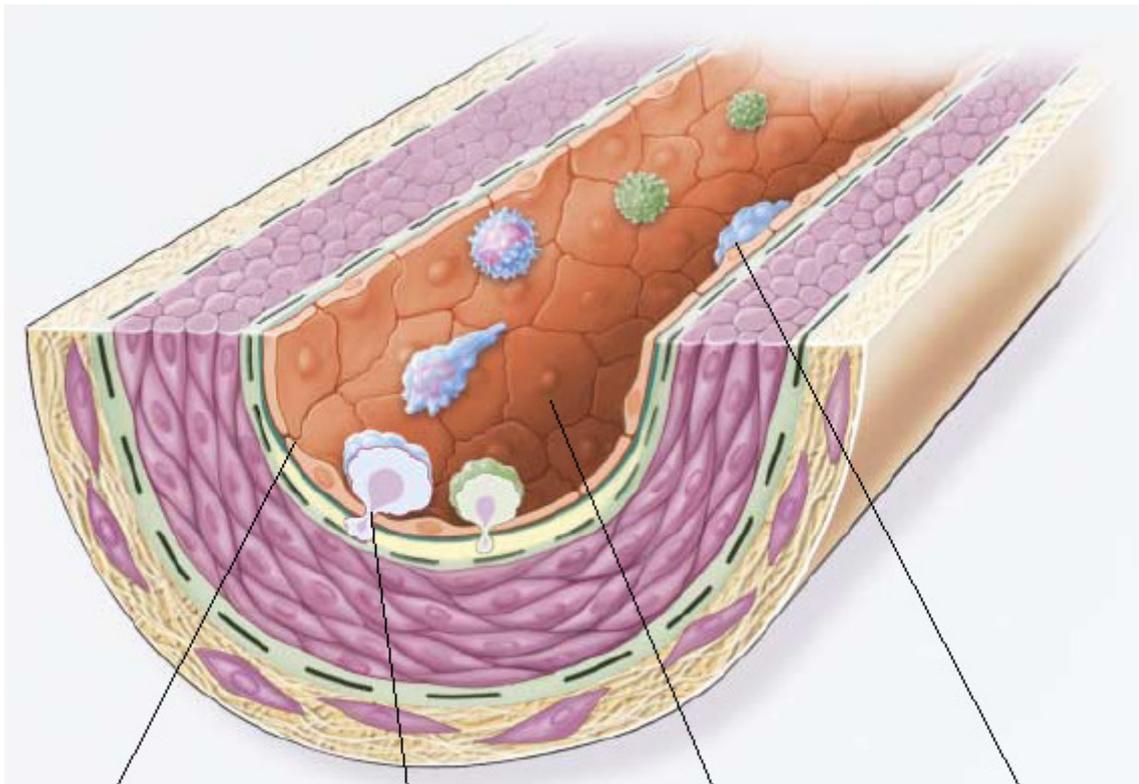
Es wurde in den letzten Jahren deutlich, dass die Pathogenese der Atherosklerose ein hochkomplexer, aktiver Prozess ist, in dessen Entwicklung die Inflammation eine zentrale Rolle spielt (Ross 1999).

Sogenannte Surrogatparameter - Parameter, die mit der Entstehung einer Atherosklerose assoziiert sind - spielen dabei auf allen Ebenen der Atherogenese eine Rolle und sind, da im Blut löslich, auch messbar (Libby 2002).

In einer Reihe von prospektiven Studien konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern wie Zytokinen (IL-6), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin), Chemokinen (MCP-1), verschiedenen klassischen Inflammationsparametern (hs-CRP, Homocystein, Lp(a), Fibrinogen), Faktoren des hämostaseologischen Systems und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten gezeigt werden (Blake 2002).

Zusätzlich wurden in den letzten Jahren in prospektiven Studien erfolgreich zahlreiche inflammatorische Biomarker bezüglich ihrer prädiktiven Aussagekraft für die Entwicklung eines Diabetes untersucht, ferner zeigte sich, dass diese bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden im Serum erhöht sind (Pickup 1997, 1998, 2004).

Die frühe Phase der Atherogenese ist gekennzeichnet durch die so genannte endotheliale Dysfunktion. Bekannte Risikofaktoren wie z. B. Rauchen, Übergewicht, körperliche Inaktivität, Hyperlipoproteinämie und Typ-2-Diabetes sowie andere bislang noch nicht identifizierte Faktoren führen zu einer Schädigung des Endothels, wodurch dessen Permeabilität für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma gesteigert ist. Im weiteren Verlauf werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt so genannte Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche (Libby 2002). Bestimmte Adhäsionsmoleküle, vor allem so genannte Selectine, vermitteln zunächst den temporären, reversiblen Kontakt bestimmter Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel. Eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, so genannte Cellular Adhesion Molecules (CAMs), vermitteln die feste Anheftung dieser Zellen an die Gefäßwand (Abb.1, Libby 2002).



Gesteigerte endotheliale  
Permeabilität

Leukozyten -  
Migration

Endotheliale  
Adhäsion

Leukozyten -  
Adhäsion

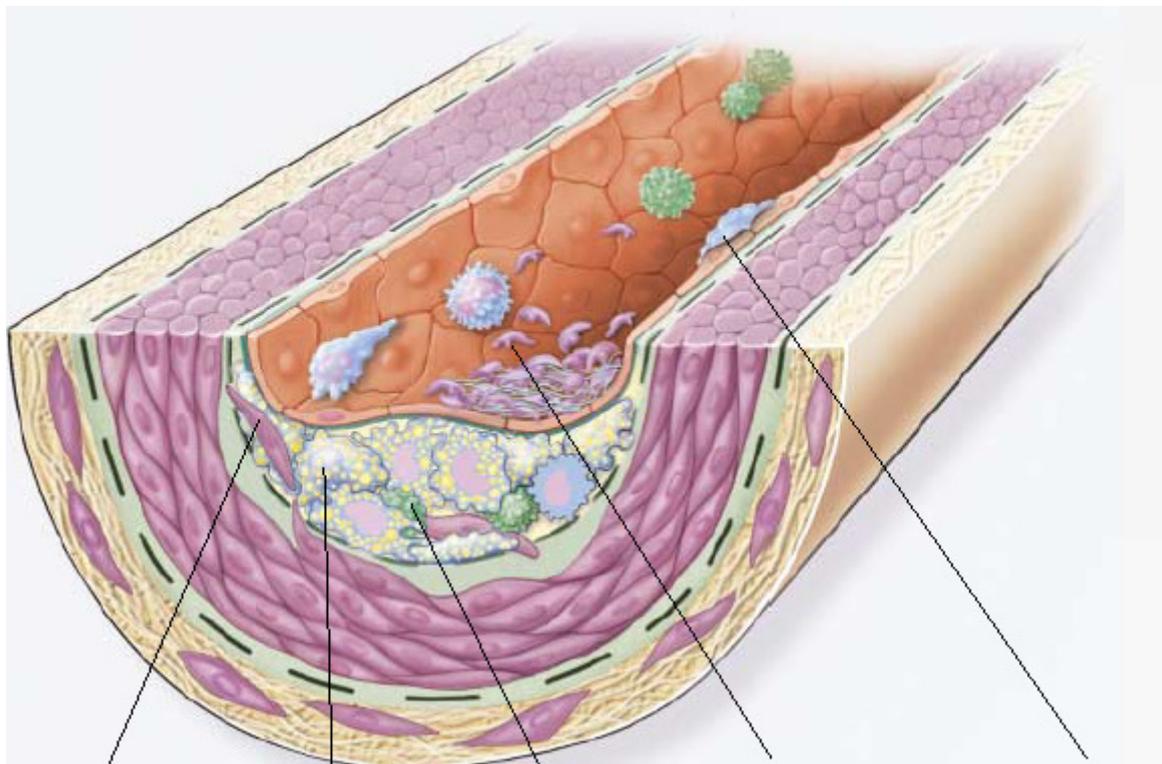
### Abb.1: Endotheliale Dysfunktion

Zu Anfang der Entstehung atheromatöser Läsionen kommt es nach dem Paradigma der "Response-to-injury"-Hypothese zu einer "Verletzung" des Endothels durch verschiedene Risikofaktoren, was zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere im Plasma zirkulierende Stoffe führt. Die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin führt zu erhöhter endothelialer Adhäsion von Leukozyten. Die folgende Migration dieser Zellen wird unter anderem vermittelt über oxidiertes LDL und MCP-1 (Ross 1999, Libby 2002).

Mechanische Kräfte spielen vor allem an Gefäßaufzweigungen – hier entstehen gehäuft arteriosklerotische Läsionen – eine Rolle. Erhöhte Scherkräfte können die Bildung von endothelalem Stickstoffmonoxid (NO) verringern (Topper 1996). NO wirkt vasodilatatorisch und besitzt antiinflammatorische Eigenschaften (De Caterina 1995). Darüber hinaus führen erhöhte Scherkräfte zu gesteigerter Bildung von Adhäsionsmolekülen mit den oben geschilderten Folgen (Nagel 1994).

Im weiteren Verlauf wandern Monozyten und in geringerem Ausmaß T-Lymphozyten per Diapedese in den subintimalen Raum ein (Libby 2002). Dies wird durch eine andere Gruppe von Molekülen, zu denen unter anderem das Chemokin Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) gehört, vermittelt (Hansson 2002). Es kommt zur Differenzierung in Makrophagen und nach Lipidaufnahme entstehen Schaumzellen

(Abb.2), die die charakteristischen Zellen der atherosklerotischen Plaque darstellen und die vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren freisetzen. Diese „inflammatorische“ Umgebung aktiviert glatte Muskelzellen in der Gefäßwand, die aus der Media in die entstehende intimale Läsion wandern und sich dort weiter teilen (Libby 2002). Endothelzellen und glatte Muskelzellen reagieren nicht nur auf Botenstoffe, sie sind auch in der Lage, diese selber zu bilden und auszuschütten und halten damit zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den inflammatorischen Prozess der Plaqueentstehung in Gang (Young 2002).



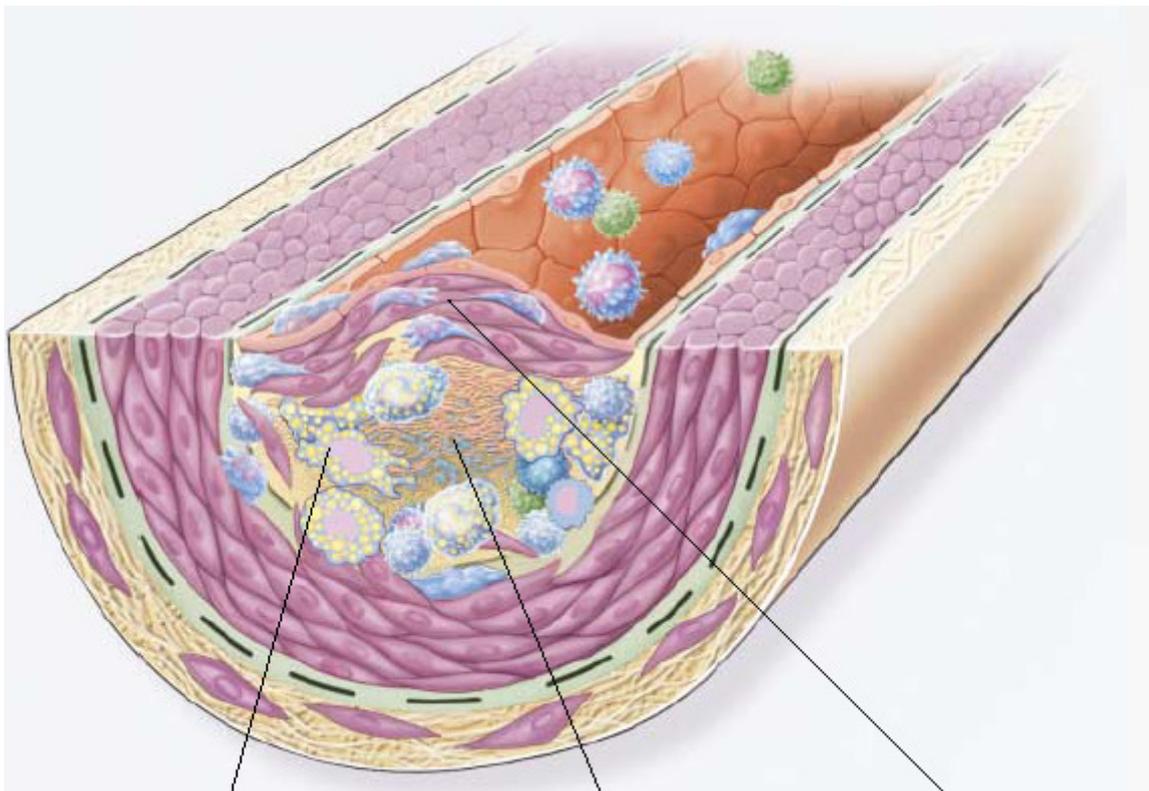
Migration von Glatten Muskelzellen	Schaumzell- formation	T-Zell Aktivierung	Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten	Adhäsion und Migration der Leukozyten
---------------------------------------	--------------------------	--------------------	---	---

**Abb.2: Bildung von „Fatty streaks“**

Sogenannte Fettstreifen ( „Fatty streaks“) bestehen aus lipidreichen Monozyten und Makrophagen ( Schaumzellen) zusammen mit T-Lymphozyten und eingewanderten glatten Muskelzellen.

Die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin über den LDL- und den Scavenger-Rezeptor der Monozyten führt zur Formierung von einzelnen Schaumzellen und nachfolgend zur Bildung der "Fatty streaks". Diese sind charakterisiert durch eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen sowie dem Auftreten von Schichten von Schaumzellen und eingewanderten glatten Muskelzellen (Ross 1999).

Im weiteren Verlauf akkumulieren Schaumzellen in der wachsenden Läsion. Durch Apoptose von Zellen und weitere Lipidaufnahme kommt es zur Bildung eines nekrotischen Kerns in der Läsion (Ross 1999). Die gleichzeitig eingewanderten glatten Muskelzellen bilden zusammen mit extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe, die das zirkulierende Blut und die atherosklerotische Plaque voneinander trennt (Abb.3, Ross 1999).



Akkumulation von Makrophagen    Bildung eines nekrotischen Kerns    Bildung einer fibrösen Kappe

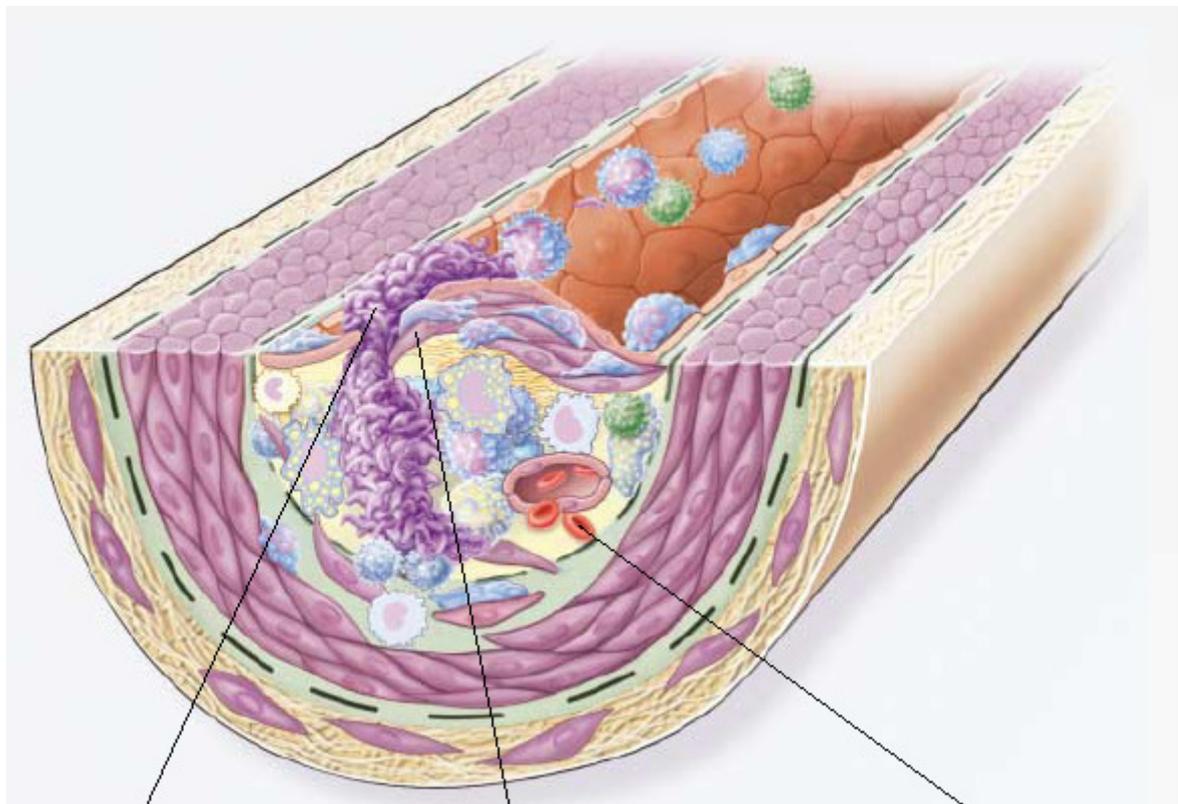
### Abb.3: Fortschreiten der Läsion

Im weiteren Verlauf kommt es zu einer kontinuierlichen Einwanderung und Akkumulation von lipidbeladenen Makrophagen sowie durch multiple extrazelluläre Lipidablagerungen zur Bildung eines Lipidkernes. Durch die Bildung einer fibrösen Kappe wird die Läsion von dem Gefäßlumen getrennt. Der nekrotische Kern ist das Ergebnis von Apoptose und Nekrose, gesteigerter proteolytischer Aktivität und Lipidakkumulation (Ross 1999).

Kommt es zur verminderten Bildung von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen und deren vermehrtem Abbau durch Enzyme - so schütten z.B. Makrophagen und Schaumzellen Matrixmetalloproteinasen aus - so folgt daraus die Ausdünnung der fibrösen Kappe und eine stabile Plaque kann instabil werden (Libby 2001). Unter dem Einfluss von Scherkräften kann die fibröse Kappe aufreißen.

Der thrombogene Lipidkern der Plaque und Kollagen in der Gefäßwand werden freigelegt. Die Aktivierung des Hämostasesystems führt zur okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombusbildung (Libby 2001). Klinisch manifestiert sich die

Plaqueruptur mit Thrombusformation als instabile Angina pectoris oder akuter Myokardinfarkt (Abb.4).



Plaqueruptur

Ausdünnung der fibrösen Kappe

Blutung aus kleinen Plaque-Blutgefäßen

**Abb.4: Instabile Plaque und Plaqueruptur**

Verminderte Bildung und verstärkter Abbau der extrazellulären Matrix führen zur Ausdünnung der fibrösen Kappe mit konsekutiver Plaque-Instabilität und drohender Rupturgefahr. Metalloproteinasen wie MMP-9 und andere proteolytische Enzyme, die von Makrophagen sezerniert werden, führen zur Instabilität der Plaque. In Folge kann es zur Ruptur mit Thrombusformation kommen (Ross 1999).

### **1.3. Diabetes mellitus und Atherosklerose**

Wie oben erwähnt, zeichnen sich Patienten mit Typ-2-Diabetes durch eine akzelerierte und progrediente Form der Atherosklerose aus.

Warum weisen gerade Diabetiker in besonderem Maße Zeichen der Inflammation und Thrombose auf ?

Hier sind vier bisher bekannte Faktoren hervorzuheben:

#### Hyperglykämie und Endothelfunktion

Patienten mit gestörtem Glukosestoffwechsel verbringen 11–12 Stunden täglich in einem postprandialen Status (Nesto 2004). Bei Patienten mit Diabetes mellitus vermindern die Hyperglykämie, die erhöhten Spiegel freier Fettsäuren und die in den meisten Fällen vorliegende Insulinresistenz die endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) - Produktion sowie dessen Bioverfügbarkeit.

Essentiell für eine normale Endothelfunktion ist die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid. NO wird in den Endothelzellen durch die endotheliale Isoform der NOSynthase (eNOS) gebildet. NO ist eine vasodilatierende Substanz, die die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an das Endothel, aber auch die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMC) verhindert. Es reduziert die Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) und inhibiert die Oxidation von low density lipoprotein- (LDL-) Cholesterin. Damit wirkt es antiatherosklerotisch und durch die Verhinderung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten auch antithrombotisch.

#### Dyslipidämie

Gemeinsam mit einem niedrigen HDL-Cholesterin (HDL-C) sind die Hypertriglyzeridämie und das „small dense“ LDL-Cholesterin (LDL-C) eine typische Konstellation bei Diabetes mellitus (Kwiterovich 2000). Erhöhte Werte von Triglyzeriden, LDL-C und erniedrigtes HDL-C sind Folge erhöhter Spiegel freier Fettsäuren. Bei Insulinresistenz ist die durch Insulin vermittelte Suppression der Lipolyse im Adipozyten gestört. In der Folge resultieren daraus verminderte Plasmaspiegel des HDL-C (Assmann 2004). Damit haben Diabetiker in vermindertem Maße einen Schutz gegen vaskuläre Ereignisse. HDL-C wirkt auf verschiedene Weise kardioprotektiv. Dazu gehören der reverse Cholesterin-Transport, die

Inhibierung der LDL-Oxidation, die Reduktion von erhöhten Spiegeln der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin) und eine gesteigerte Fibrinolyse (Calabresi 2003). Bei Patienten mit Diabetes kommt es dann wegen der Verminderung des HDL-C zu einer Steigerung der LDL Oxidation. Das oxidierte LDL-C stimuliert dann im folgenden u.a. die Produktion von MCP-1, induziert die Adhäsion von Monozyten an der Endothelzelloberfläche und erhöht die Produktion von plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1) im Sinne eines prothrombotischen Milieus (O`Connell 2001).

#### Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

NO wird aus L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase gebildet. Im Körper kommen dem L-Arginin chemisch ähnliche Verbindungen vor, die an den entsprechenden Stellen ein oder zwei Methylgruppen tragen, und so die Bildung von NO kompetitiv blockieren können. Eine dieser Substanzen ist asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA). Bei einer Reihe kardiovaskulärer Risikofaktoren sind erhöhte ADMA-Spiegel nachgewiesen worden. Dazu zählen Alter, Hypertonie, Diabetes mellitus, Insulinresistenz, gestörte Glukosetoleranz, Hypertriglyzeridämie und Hyperhomocysteinämie. Erhöhte ADMA-Spiegel sind mit kardiovaskulären Komplikationen wie Apoplex, Herzinsuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und ausgeprägter Atherosklerose assoziiert (Böger 2004). ADMA reduziert die NO-Synthese, erhöht die Adhäsivität von Monozyten für Endothelzellen und steigert die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) [Cooke 2004].

Mononukleäre Zellen von Patienten mit Hypercholesterinämie sind hyperadhäsiv und es konnte gezeigt werden, dass dies positiv mit dem Plasma-ADMA Spiegel korreliert (Cooke 2004). ADMA aktiviert auch NF- $\kappa$ B (Nuclear Faktor-kappa B) und induziert so die Expression proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle. LDL-C und ox-LDL-C wiederum erhöhen die ADMA-Bildung in Endothelzellen (Cooke 2004).

Advanced glycation end products (AGE)

Obwohl die Hyperglykämie eine Reihe von proatherogenen Mechanismen in Gang setzt, fällt dem Anstieg nicht-enzymatischer Glykosylierung von Proteinen und Lipiden mit der Bildung und Ablagerung von „advanced glycation end products“ (AGE) in der Pathogenese der akzelerierten Atherosklerose beim Diabetiker die Schlüsselrolle zu.

AGE sind Produkte einer nicht enzymatischen Reaktion zwischen Glukose und Aminogruppen von Proteinen.

In immunhistochemischen Analysen von atherosklerotischen Plaques mit monoklonalen Anti-AGE-Antikörpern zeigten sich sowohl diffuse extrazelluläre als auch dichte intrazelluläre AGE-Ablagerungen in Makrophagen und glatten Muskelzellen. Die AGE-Konzentration korrelierte dabei mit dem Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen (Basta 2004). Außerdem können AGE die Integration und Funktion von Gefäßen stören, indem sie Verbindungen zwischen Makromolekülen und der Gefäßwand herstellen, wodurch eine Reihe von Zellen am Endothel adhären werden können.

Auch kommt es durch AGE über Aktivierung von Nuklear Faktor-(NF-)  $\kappa$ B zu einer gesteigerten Expression von E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1, wodurch es zu vermehrter Interaktion von zirkulierenden Monozyten mit dem Gefäßendothel bei Diabetikern kommt (Schmidt 1995, Basta 2002).

## **1.4. Inflammationsmarker der Atherosklerose**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es im Rahmen einer prospektiven Studie den Einfluss einer Insulintherapie auf Surrogatparameter der Atherosklerose bei Patienten mit Typ-2-Diabetes zu untersuchen.

Im folgenden soll auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Parameter näher eingegangen werden.

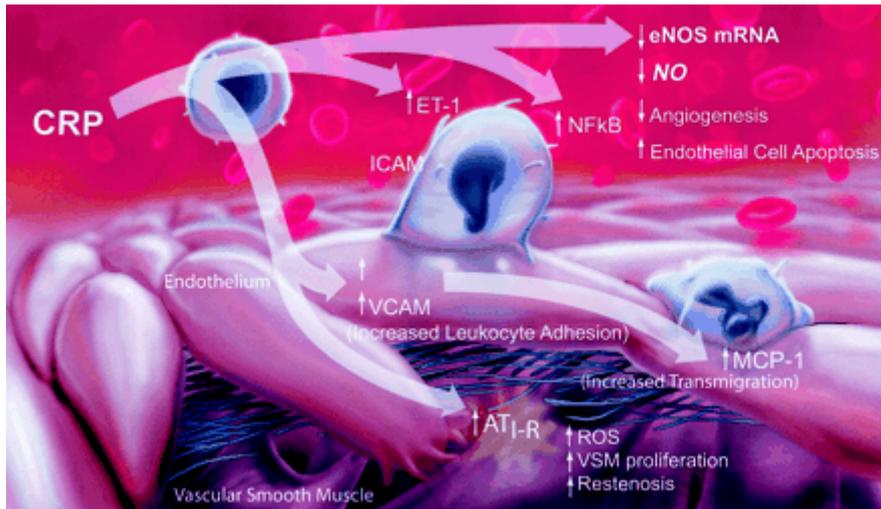
### **1.4.1. Inflammationsmarker**

Das C-reaktive Protein (CRP), ein vor allem in der Leber synthetisiertes, aus fünf 23 kD großen Untereinheiten bestehendes zirkulierendes Pentraxin, ist der bislang am häufigsten untersuchte inflammatorische Marker (du Clos 2000). Das CRP hat seinen Namen von seiner Fähigkeit mit dem C-Polysaccharid der Pneumokokken Präzipitate zu bilden. Induziert u.a. durch proinflammatorische Cytokine wie Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  und Interleukin-6, steigt dessen Konzentration bei Entzündungen, Infektionen oder Traumata an (Gabay 1999).

Obwohl im Allgemeinen als Akute-Phase- Protein bezeichnet, deutet eine Reihe von Untersuchungen auch auf eine direkte Beteiligung des CRP bei der Entstehung der Atherosklerose hin (Abb.5). Darüber hinaus zeigen Untersuchungen, dass neben Hepatozyten auch SMC (glatte Muskelzellen) in menschlichen Koronararterien einen Syntheseort darstellen und dies vor allem in atherosklerotischen Gefäßabschnitten (Calabro 2003).

Das CRP beeinflusst die Fibrinolyse, die Expression von Adhäsionsmolekülen und fördert die endotheliale Dysfunktion (Szmitko 2003).

Auch Mausmodelle belegen die wichtige Rolle des CRPs in der Atherogenese. So wurde ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko und eine gesteigerte Atherogenese bei genetisch veränderten Mäusen, die humanes CRP exprimieren, festgestellt (Danenberg 2003, Paul 2004).



### Abb.5: CRP, Inflammation und endotheliale Aktivierung

Das CRP ist der bislang am besten untersuchte Risikomarker der Atherosklerose. Neben seiner neuen Rolle als Marker und seiner klassischen Funktion als Akute Phase Protein trägt das CRP auch neueren Erkenntnissen zur Folge zur Pathogenese der Atherosklerose bei. CRP führt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (u.a. VCAM-1, ICAM-1), Chemokinen (MCP-1), sowie nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), erniedrigt die mRNA der endothelialen Isoform der NO-Synthase und damit auch die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und steigert die ROS Produktion sowie die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSM). Auch vasokonstriktische Faktoren wie Endothelin-1 (ET-1) und der Angiotensin - Typ-1 Rezeptor scheinen durch das CRP hochreguliert werden zu können (Szmítko 2003).

Mittlerweile mehr als 20 prospektive, epidemiologische Studien zeigen das CRP als unabhängigen prädiktiven Risikomarker für Myokardinfarkt, pAVK, Apoplex und plötzlichen Herztod bei scheinbar gesunden Individuen. So ist das Risiko zwei- bis vierfach erhöht für kardiovaskulären Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und pAVK, sowohl einzeln untersucht wie auch als kombinierter Endpunkt, wenn man die oberste mit der untersten Quartile der CRP-Konzentration vergleicht (Torres 2003).

Auch das Zytokin Interleukin-6, ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das je nach Glykosylierungsgrad ein Molekulargewicht von 22 bis 26 kD besitzt (May 1991), wird als klassisches proinflammatorisches Zytokin bezeichnet (Coppack 2001), gilt aber vor allem als Marker von Entzündungen im Organismus. Hierbei kann die Konzentration im Plasma z.B. durch bakterielle Endotoxine induziert, von Normwerten unter 10 pg/ml auf das 100 – bis 1000fache ansteigen. IL-6 bewirkt eine Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen, eine Reifung der B-Zellen sowie in der Leber die Bildung von Akute Phase Proteinen wie unter anderem des CRP.

Homocystein (HCY), eine schwefelhaltige Aminosäure mit Funktion im Methionin-Stoffwechsel, gilt als ein weiterer kardiovaskulärer Risikoindikator (Hankey 1999, Christen 2000, Poddar 2001, Bostom 1999).

Homocystein liegt im Plasma in drei Formen vor: freies oder ungebundenes HCY ( 1-2 % ), Homocysteindimere ( 10-20 %), oder proteingebunden ( >80%).

Gesamt-Plasma-Homocystein (HCY), frei und gebunden, wird allgemein als Homocystein bezeichnet (Langman 1999).

Eine Beziehung zwischen Homocysteinurie und der Entwicklung vorzeitiger atherosklerotischer Erkrankungen wurde vor über 30 Jahren zum ersten Mal beobachtet (McCully 1969). Erste Hinweise auf die Bedeutung des Homocysteins für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ergaben sich aus Beobachtungen an Patienten mit der seltenen erblichen homozygoten Form der Homocysteinurie. Ein Großteil der Betroffenen entwickelt vor dem Alter von 30 Jahren kardiovaskuläre Komplikationen (Welch 1998). Dabei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. So führt Homocystein zur endothelialen Dysfunktion, Plättchenaggregation und zur verstärkten Oxidation von LDL-C (Poddar 2001).

Prospektive Kohortenstudien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Homocystein und kardiovaskulären Erkrankungen belegen (Bostom 1999, Nygard 1997). Neuere Metaanalysen u.a. von Wald et al. brachten wiederum widersprüchliche Ergebnisse und konnten keine starke Korrelation finden (Wald 2002, Homocysteine Studies Collaborations 2002).

Interventionsstudien, mit dem Ziel durch Senkung erhöhter Homocysteinspiegel mittels Folsäure und den Vitamin B6 und B12 eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse zu erreichen, erbrachten nicht die erhofften Ergebnisse. In der bisher größten Untersuchung, der Hope-2 Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation Trial), die 5522 Patienten umfasste- die meisten mit manifester Gefäßerkrankung -, konnte trotz Senkung der Homocystein - Konzentration mit Vitaminen (2,5 mg Folsäure, 50 mg Vitamin B6 und 1 mg Vitamin B12) in der Verumgruppe keine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse erreicht werden. (Lonn 2006).

Lipoprotein(a) [Lp(a)] gehört zur Klasse der cholesterinreichen, apoB-haltigen Lipoproteine des menschlichen Plasmas. Es besteht aus einem Low Density Lipoprotein (LDL)-Partikel und dem spezifischen Antigen, Apolipoprotein-a [Apo(a)], wobei letzteres über eine Disulfidbrücke mit ApoB verbunden ist (Kostner 1992).

Die Mittelwerte für Lp(a) in der weißen Bevölkerung betragen 17 mg/dl. Als Grenzwert, ab welchem ein erhöhtes Atheroskleroserisiko auftritt, gilt allgemein 25–30 mg/dl (Kostner 1990). Die Atherogenität von Lp(a) wurde in zahlreichen prospektiven Studien dokumentiert und ebenso konnte gezeigt werden, dass Patienten mit erhöhtem Lp(a) ein höheres vaskuläres Risiko haben (Danesh 2000, Luc 2002). Seine Strukturähnlichkeit mit Plasminogen bedingt möglicherweise eine kompetitive Hemmung der endogenen Fibrinolyse (Loscalzo 1990), außerdem findet es sich gehäuft in atherosklerotischen Läsionen (Caplice 2001, Buechler 2001). Jedoch ist über eine mögliche physiologische Funktion von Lp(a) sehr wenig bekannt.

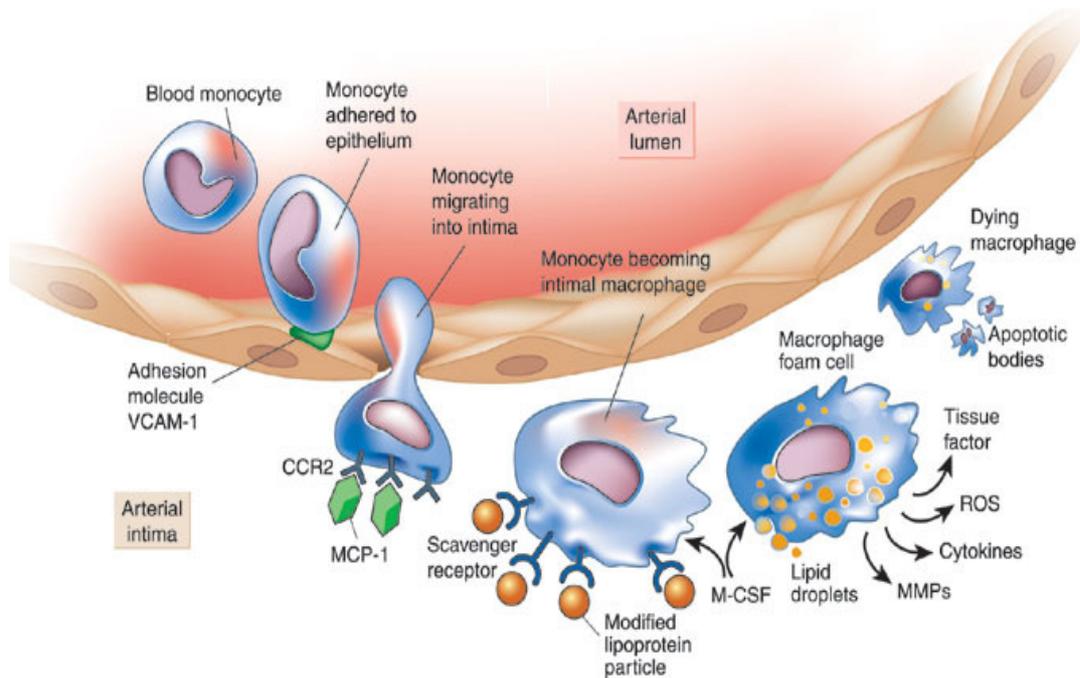
## **1.4.2. Endotheliale Marker**

### **ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin**

Zu den Adhäsionsmolekülen werden E-Selectine, ICAM-1 und VCAM-1 gezählt.

Ihnen fällt bei der Leukozytenmigration im Rahmen der Atherogenese eine zentrale Rolle zu (Abb.6).

Das E-Selectin gehört zur Gruppe der Selectine, einer Gruppe monomerer Proteine, die sowohl von endothelialen als auch leukozytären Zellen exprimiert werden. Benannt nach der Lektin-ähnlichen Bindungsstelle, interagieren sie mit muzinähnlichen Glykoproteinen. Selectine vermitteln den initialen Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel und bewirken ein Rollen der Leukozyten auf dem aktivierten Endothel (Lawrence 1991, McEver 1995, Springer 1994).



**Abb.6: Modell der Leukozytenmigration und Rolle der endothelialen Marker**

Schema der Abfolge der Leukozytenmigration in das Endothel von links nach rechts. Selectine vermittelten initial ein Rollen der Leukozyten auf dem Endothel. Es folgt der feste Arrest durch endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1. Die gerichtete Migration ins Gewebe benötigt einen Chemokingradienten. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und sein CCR-2 Rezeptor aktivieren Monozyten und führen zur Chemotaxis in die Intima. Über Scavenger - Rezeptor vermittelte Lipidaufnahme führt zur Schaumzellbildung. Die dadurch aktivierten lipidbeladenen Makrophagen sezernieren Zytokine und Metalloproteinasen wie MMP-9, die zum Abbau der extrazellulären Matrix und zur Ausdünnung der fibrösen Kappe der atheromatösen Läsion führen (Libby 2002).

Dies ist eine essentielle, aber auch reversible Voraussetzung für die nachfolgenden Schritte der festen Adhäsion und Diapedese von Leukozyten. Zusätzlich zu ihrer Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung im Rahmen entzündlicher Prozesse beteiligen sich die Selectine auch bei der Steuerung der Leukozytenrezirkulation und fungieren als sogenannte homing Rezeptoren und Addressine (Springer 1994).

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) zählen, aufgrund ihrer den Antikörpern ähnlichen Struktur von variablen und konstanten Domänen, zur Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie (Williams 1988, Bork 1994, Holness 1994).

ICAM-1 besitzt fünf Immunglobulindomänen und wird durch entzündliche Stimuli wie IL-1, TNF- $\alpha$ , Lipopolysaccharide und Interferone in seiner Expression induziert (Pober 1986, Springer 1990).

VCAM-1 besteht aus sieben Immunglobulindomänen, wird von endothelialen Zellen exprimiert und durch entzündliche Stimuli in seiner Expression deutlich hochreguliert (Bevilacqua 1993).

E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 vermitteln die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten in die Arterienwand. Hierbei kommt es im Rahmen der endothelialen Dysfunktion zu Beginn der Atherogenese zur Hochregulation unter anderem dieser Adhäsionsmoleküle (Ross 1999).

Mehrere Studien bei Patienten mit KHK fanden erhöhte Konzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin im Vergleich zu gesunden Probanden (Wallen 1999, Ridker 1998, Blankenberg 2001, Kowalska 2002).

Außerdem zeigte sie sich in mehreren Studien eine Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für ICAM-1 und E-Selectin, weniger jedoch für VCAM-1, zeigt sich eine deutliche Assoziation mit der Atherosklerose (Hwang 1997, Christie 2002).

Ob die Bestimmung dieser Adhäsionsmoleküle viel Zusatzinformation zur Bestimmung der etablierten Inflammationsmarker und Risikofaktoren bringen wird, ist gegenwärtig Gegenstand der Diskussion (Malik 2001).

## **MCP-1**

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), ein Polypeptid mit einer Größe von 8,7 kDa, ist ein Mitglied der CC Chemokinfamilie. Zusammen mit Selectinen und Integrinen beteiligen sie sich an der Steuerung der Leukozytenmigration.

Die biologische Wirkung der Chemokine wird über Rezeptoren vermittelt. MCP-1 entfaltet seine Wirkung über Bindung an den CC Chemokine Rezeptor 2 (CCR2), der hauptsächlich auf Monocyten exprimiert wird, aber auch von T – Lymphozyten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten (Yoshimura 1991 und 1992).

Eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Untersuchungen der letzten Jahre unterstreicht die Bedeutung von MCP-1 als einen wichtiger Faktor in chronisch entzündlichen Prozessen wie der Atherosklerose und haben ihn deshalb auch als bisher einzig messbares Chemokin als Inflammationsmarker interessant gemacht (Ross 1999, Libby 2002).

Die überaus wichtige Rolle von MCP-1 in der Atherogenese konnte in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden. So zeigten Mäuse mit Überexpression von MCP-1 eine dreifach gesteigerte Lipideinlagerung in atherosklerotischen Plaques in

die Aorta und nach der Blockade des MCP-1 spezifischen Rezeptors zeigten apoE defiziente Mäuse dreimal weniger atherosklerotische Läsionen in der Aorta im Vergleich zu apoE defizienten Mäusen ohne CCR2- Blockierung (Han 1999, Kowala 2000).

In atherosklerotisch veränderten arteriellen humanen Gefäßen konnte im Gegensatz zu gesunden Gefäßen eine Überexpression von MCP-1 nachgewiesen werden. Zusätzlich waren in den atherosklerotischen Plaques vor allem die makrophagenreichen Regionen reich an MCP-1 (Nelken 1991, Yla-Herttuala 1991).

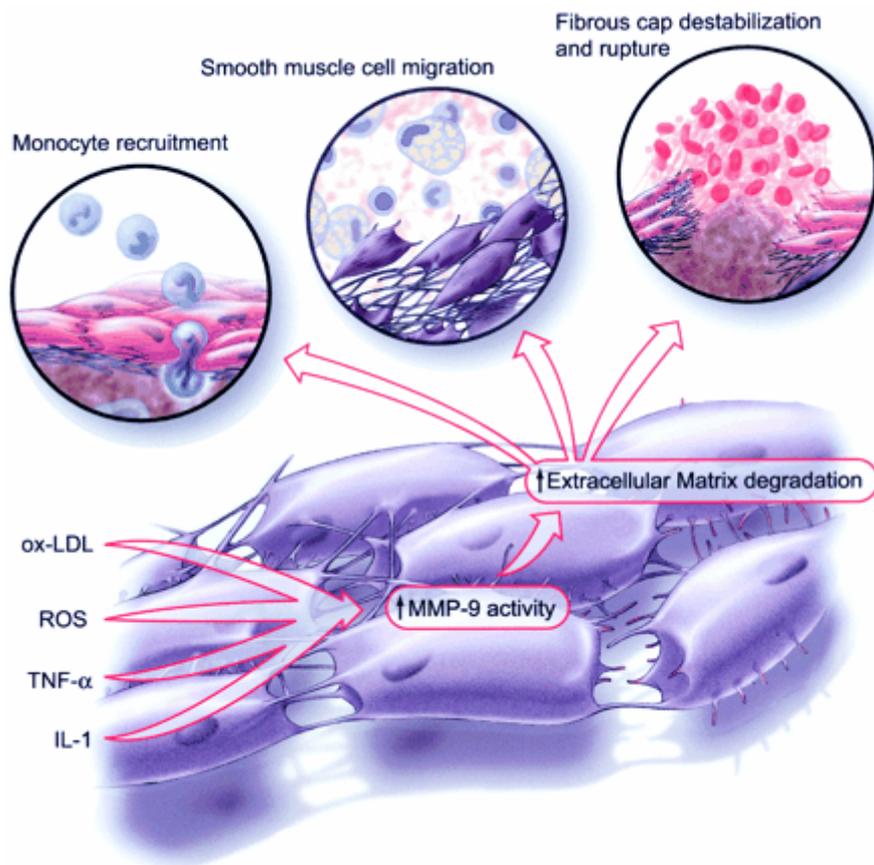
Mehrere klinische Studien fanden eine Assoziation von erhöhten MCP-1-Plasmaspiegeln mit kardiovaskulären Ereignissen wie arteriellem Hypertonus, Herzinfarkt und Angina Pectoris (Ikeda 2002, Mazzone 2001, Lemos 2003).

Außerdem scheint MCP-1 mit Restenoseraten nach Angioplastie zu korrelieren. Der MCP-1 Plasmaspiegel bei Patienten mit einer Restenose war 48 Stunden und 6 Monate nach Stentimplantation deutlich erhöht.

Entzündliche Veränderungen mit Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Arterienwand werden als Hauptursache eines frühen Restenoseprozesses nach einer Angioplastie oder Stentimplantation angesehen. Interaktionen zwischen MCP-1 mit seinen CCR-2 Rezeptoren scheinen eine zentrale Rolle in diesem Prozess zu spielen (Mori 2002, Oshima 2001).

## **MMP-9**

MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase-9), eine 92 kDa große Gelatinase, gehört der Familie der Metalloproteinasen an, einer Gruppe zink- und kalziumabhängiger Endopeptidasen. Diese sind in der Lage, die extrazelluläre Matrix, die u.a. aus Kollagenen, Proteoglykanen und Fibronectin besteht, aufzulösen (Werb 1997, Nagase 1999). MMP-9 befindet sich besonders in den Schaumzell - reichen Regionen atheromatöser Plaques (Abb.7).



**Abb.7: MMP-9, von der Progression zur Destabilisierung der Plaque**

Aktivierung von MMP-9 führt zum Abbau der extrazellulären Matrix. Dies erleichtert eine Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen in die sich bildende Plaque. In der Folge führt exzessive MMP-9 Aktivität zur Ausdünnung der fibrösen Kappe, zur Plaque –Instabilität und schließlich zur Ruptur der Plaque (Szmitko 2003).

Unterschiede in der MMP-9 Expression korrelieren mit dem Vorhandensein und der Stärke der Ausprägung der Atherosklerose (Galis 2002, Morgan 2003). Auch bei der Plaqueruptur scheinen Matrixmetalloproteinasen eine Rolle zu spielen (Newby 1999, de Nooijer 2006). Death et al. konnten zeigen, dass Hyperglykämie die Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP) in Endothelzellen und Makrophagen erhöht (Death 2003).

Neuere klinische Studien zeigen eine Assoziation der MMP-9- Konzentration im Serum mit vorzeitiger Koronarsklerose (Noji 2001), als auch mit instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkten (Inokubo 2001) und untermauern damit die wachsende Bedeutung von MMP-9 als Inflammationsmarker der Atherosklerose.

### **1.4.3. Hämostaseologie, Gerinnungsfaktoren und Marker der Fibrinolyse**

Die Rolle des hämostaseologischen Systems bei der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit und ihrer akuten Komplikationen instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod, hat in den letzten Jahren zunehmendes Interesse gefunden, da sich in einer Reihe von Untersuchungen auch einzelne hämostaseologische Faktoren als Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit erwiesen haben (Kannel 2005). Außerdem hat sich gezeigt, dass im Rahmen des Diabetes eine Vielzahl von Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor XI, Faktor XII, Kallikrein und von Willebrand Faktor erhöht sind (Carr 2001, Acang 1993, Carmassi 1992). Ebenso ist die Fibrinolyse vermindert, unter anderem durch erhöhte Konzentration von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1 (PAI-1) (Carr 2001). All dies lässt es - so Carr - zu, Diabetes mellitus als „hypercoagulable state“ zu bezeichnen.

#### **Fibrinogen**

Fibrinogen, das Substrat des Thrombins und des Plasmins, wird in der Leber synthetisiert und gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine.

Fibrinogen ist ein unabhängiger Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen (Framingham-Studie, Northwick Park Heart - Studie, Wilhelmsen 1984, Kannel 1987, Ma 1999, Danesh 1998).

Danesh et al. (2005) fanden nach Durchführung einer Meta-Analyse von 31 prospektiven Studien mit insgesamt 154 211 Teilnehmern, ohne bekannte KHK oder Apoplex in der Anamnese, eine Assoziation von Fibrinogen mit dem Risiko einer KHK und eines Apoplex .

In großen prospektiven Studien korrelierte die Plasmakonzentration von Fibrinogen unabhängig von anderen Faktoren sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit der Inzidenz von akutem Myokardinfarkt und plötzlichem Herztod (Ernst 1993, Heinrich 1994, Meade 1993, Thompson 1995). Selbst bei hohem LDL-Cholesterin im Serum war das koronare Risiko bei niedrigem Fibrinogen im Plasma relativ gering (Heinrich 1994, Thompson 1995). Der erhöhte Fibrinogenspiegel reflektiert wohl nicht nur die atherosklerotische

Entzündungsreaktion, sondern könnte auch an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sein. So stimuliert Fibrinogen die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, begünstigt die Thrombozytenaggregation und ist Bestandteil atherosklerotischer Plaques (Folstom 1997).

## **PAI-1**

PAI-1 („plasminogen activator inhibitor type-1“) ist ein einkettiges Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 50 000 Da, das in Endothelzellen und Hepatozyten synthetisiert wird. PAI-1 reguliert die Fibrinolyse durch Hemmung von t-PA (tissue-type plasminogen activator) und der vor allem im Gewebe vorkommenden u-PA (Urokinase). Im Plasma wird PAI-1 durch Bindung an Vitronektin stabilisiert oder zirkuliert als inaktiver Komplex mit Urokinase oder t-PA (Saksela 1988).

Die in unserer Studie bestimmte PAI-1 -Aktivität erlaubt eine Abschätzung des Überschusses an PAI-1 (Inhibitor der Fibrinolyse) über t-PA und u-PA (Aktivatoren der Fibrinolyse) und ist in diesem Zusammenhang ein geeigneter Marker, um den Überschuss der Hemmung der Fibrinolyse im Blut abzuschätzen. Erhöhte PAI-1-Spiegel sind z.B. bei thromboembolischen, septischen und malignen Erkrankungen nachweisbar.

Unter den Faktoren des fibrinolytischen Systems besteht für PAI-1 der engste Zusammenhang mit verschiedenen vaskulären Erkrankungen (Nordt 1999).

Erhöhte PAI-1 Spiegel scheinen das Risiko atherothrombotischer Vorfälle zu erhöhen und möglicherweise auch die Progression der Atherosklerose zu befördern (Vaughan 2005).

Prospektive Studien zeigen eine Assoziation zwischen erhöhten PAI-1- Spiegeln und kardiovaskulären Erkrankungen. So zeigte sich in einer prospektiven Studie von Thogersen et al. (1998), dass erhöhte PAI-1- Spiegel einen Risikofaktor für einen Myokardinfarkt bei Männern und Frauen darstellen und Hamsten et al. (1987) fanden eine Assoziation von erhöhten PAI-1-Spiegel mit dem Risiko eines Re-Infarktes bei Männern mittleren Alters.

## **Faktor VII**

Faktor VII ist ein einkettiges, Vitamin-K abhängiges, Plasma-Glykoprotein, welches in der Leber synthetisiert wird. Während des Gerinnungsvorganges wird Faktor VII proteolytisch durch Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa oder Faktor XIIa zur Serinprotease Faktor VIIa aktiviert. Bei der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque wird unter anderem subendothelialer Gewebefaktor (Tissuefaktor) freigesetzt. Dieser aktiviert Faktor VIIa und der entstandene Enzymkomplex katalysiert die Umwandlung von Faktor IX zu IXa und von Faktor X zu Xa (Eilertsen 2004).

In den prospektiven Northwick-Park-Heart- und PROCAM-Studien konnte bei gesunden Männern eine Korrelation zwischen der Faktor VII - Aktivität und der Häufigkeit von tödlichen Myokardinfarkten oder plötzlichem Herztod beobachtet werden (Heinrich 1994, Meade 1993).

## **Faktor VIII**

Faktor VIII ist ebenso ein Plasma-Glykoprotein, dessen Syntheseort hauptsächlich in der Leber wie auch in Endothelzellen liegt. Faktor VIIIa ist Cofaktor des Faktor IXa bei der Faktor X Aktivierung. Das Faktor-VIII-Molekül ist nicht kovalent an den von-Willebrand-Faktor gebunden, der den Faktor VIII im Plasma vor Proteolyse schützt (Kannel 2005).

## **D-Dimer**

Das D-Dimer ist ein Spaltprodukt des Fibrins. Am Ende des plasmatischen Gerinnungsablaufs steht die Quervernetzung des löslichen Fibrins zum unlöslichen Fibrin. Die Fibrinolyse als Gegenreaktion hat die Aufgabe, das Fibringerinnsel wieder zu lysieren. Im Mittelpunkt dieses Systems steht die Endopeptidase Plasmin, welche das unlösliche Fibrin an spezifischen Stellen spaltet. Dieser Vorgang vollzieht sich in mehreren Stufen über hochmolekulare Fragmente und lösliche Aggregate bis zu den D-Dimer-Fragmenten, die durch Plasmin nicht weiter abgebaut werden können. Der Nachweis der D-Dimere ermöglicht einen direkten Nachweis der Plasmin-Aktivität. Werte im Referenzbereich (< 500 ng/Liter Plasma) dienen der Ausschlussdiagnostik

einer Lungenembolie, einer DIC (Disseminierte Intravasale Koagulopathie) oder der tiefen Beinvenenthrombose (Palareti 1993).

Auch das D-Dimer wurde als Risikofaktor der Atherosklerose identifiziert (Lowe 2004). So konnte gezeigt werden, dass Fibrin-Spaltprodukte wie unter anderem das D-Dimer, verschiedene Effekte auf Entzündungsprozesse und Akut-Phase-Antworten haben. Unter anderem kommt es zur Aktivierung von Monozyten, zur Sekretion von Cytokinen (u.a. IL-6, IL-1) und zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, einschliesslich des CRPs und des Fibrinogens (Ritchie 1982, Edgington 1985, Gauldie 1990, Robson 1994).

Prospektive Studien der letzten Jahre zeigen eine signifikante Assoziation zwischen der Konzentration des D-Dimers und der koronaren Herzerkrankung. Patienten mit D-Dimer Werten im oberen Drittel haben ein um 70 % höheres KHK-Risiko als jene mit Werten im unteren Drittel (Danesh 2001, Ridker 1984, Lowe 2001, Folsom 2001).

## **1.5. Insulin: pro- oder antiinflammatorisch ?**

Die Insulinresistenz, zusammen mit Übergewicht, arteriellem Hypertonus, gestörter Glukosetoleranz bzw. Diabetes und Dyslipidämie - charakterisiert durch hohe Triglyzeride und niedrigem HDL - ist Bestandteil des Metabolischen Syndroms (Eckel 2005).

Dieses wiederum ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko einer Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 (Grundy 2004) und an kardiovaskulären Erkrankungen (Isomaa 2001, Lakka 2002, Malik 2004).

Mehrere Studien zeigen, dass das Metabolische Syndrom Prädiktor eines zukünftigen Diabetes sein kann (Hanson 2002, Laaksonen 2002).

Die Insulinresistenz spielt eine grundlegende Rolle bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms. Vergrößerte Adipozyten vor allem des viszeralen Fettgewebes werden gegenüber den anti-lipolytischen Wirkungen von Insulin resistent und es kommt zum Überschuss von zirkulierenden freien Fettsäuren (Goldstein 2002).

Diese bewirken in der Leber eine gesteigerte Produktion von Glukose und Triglyzeriden und reduzieren in Muskelzellen die Insulin-vermittelte Aufnahme von Glukose. Schließlich kommt es durch die erhöhte Glukose im Blut und zum Teil durch Steigerung der Insulinsekretion im Pankreas durch die freien Fettsäuren zur Hyperinsulinämie (Eckel 2005).

Die Rolle von Insulin in der Atherogenese ist seit Jahren Gegenstand der Diskussion (Dandona 2002).

Bisherige Daten, die eine Assoziation der Hyperinsulinämie mit der koronaren Herzerkrankung und mit der Atherosklerose zeigten, wurden als Beweis aufgeführt, dass Insulin einen Atherogenese-fördernden und pro- inflammatorischen Effekt haben könne (Festa 1999, Kekalainen 1996, Stout 1991,1992 und 1996).

Auch in vitro Untersuchungen, die einen Anstieg von Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived Growth Faktor (PDGF) und des kardiovaskulären Risikofaktors PAI-1 unter sehr hohen Insulindosen zeigten, unterstrichen diesen potentiellen Effekt (Begum 1998, Goalstone 1998, Juhan-Vague 1989, Alessi 1988, Schneider 1991).

Jedoch nicht alle Studien zeigten diese Assoziation. So fehlte dieser Zusammenhang gänzlich in einer großen Studie mit älteren Patienten (Wingard 1995).

Auch das Fehlen eines vermehrten Auftretens der Atherosklerose bei Patienten mit Insulinom und daraus resultierender chronischer Hyperinsulinämie widerspricht einem unmittelbarem Zusammenhang (Leonetti 1993).

Eine Reihe neuerer Funde haben nun einen potentiellen antiinflammatorischen und antiatherogenen Effekt von Insulin neben seinen bekannten metabolischen Wirkungen zeigen können (Dandona 2002 und 2005).

So werden durch Insulin drei wichtige pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren und damit korrespondierende Gene, die Inflammation vermitteln, in ihrer Aktivierung gehemmt: NF- $\kappa$ B, activator protein-1 (Ap-1) und early growth response-1 (EGR-1). Damit korrespondierende Gene, die Inflammation vermitteln, kodieren u.a. für MCP-1, ICAM-1, Il-6, MMP-9 sowie PAI-1 und werden somit durch Insulin gehemmt (Dandona 2003 und 2001, Aljada 2002, Ghanim 2001). In einer Studie an Patienten mit akutem Koronarsyndrom konnte durch eine Insulininfusion ein Absinken von PAI-1 beobachtet werden (Chaudhuri 2004). Bei Patienten mit Typ-2-Diabetes konnte durch eine Insulintherapie eine signifikante Reduktion des hs-CRP erreicht werden (Takebayashi 2004).

Insulin besitzt auch vasodilatorische Eigenschaften und fördert die endotheliale NO-Produktion (Yki-Jarvinen 2003). In seinen Zielorganen stimuliert Insulin sowohl den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Pathway (PI3-K-Pathway) als auch den mitogenaktivierten Proteinkinase-Pathway (MAPK) (Kim 2006, Creager 2003). Die Aktivierung des PI3-K-Pathways ist für die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Zielorgane wichtig. Dieser Pathway reguliert die insulinabhängige endotheliale NO-Produktion. Bei Übergewichtigen und Diabetikern ist die Funktion dieses Mechanismus deutlich reduziert und steht somit in einem engen Zusammenhang mit der Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom (Kobayashi 2005). Die verminderte Aktivität des PI3-K-Pathways durch Insulin führt zu vermehrter Stimulation des MAPK-Pathways (Toba 2006). Über diesen Weg stimuliert Insulin das Zellwachstum und die Migration von SMC und Monozyten. Es werden aber auch die Expression von PAI-1, ICAM-1 und MCP-1 vermittelt. Der MAPK-Pathway wirkt migrationsfördernd, proinflammatorisch, prothrombogen und somit proatherogen (Hsueh 2003).

## **1.6. Die Rolle der Insulintherapie bei Patienten mit Typ-2-Diabetes**

Die Rolle der Insulintherapie bei der Verbesserung der diabetischen Stoffwechseleinstellung und bei der primären und sekundären Prävention von mikrovaskulären Komplikationen sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde in einer Reihe großer prospektiver Studien dokumentiert (Diabetes Control and Complications Trial [1993], Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study [EDIC 2003], UKPDS 33 [1998], Ohkubo [1995], Kumamoto Study [Shichiri 2000] ).

Eine verbesserte diabetische Stoffwechseleinstellung reduziert sowohl das Risiko einer Entwicklung mikrovaskulärer Komplikationen wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie als auch deren Voranschreiten (Ohkubo 1995).

Die Frage, ob eine Insulintherapie makrovaskuläre Morbidität und Mortalität reduzieren kann, ist jedoch ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Studie war es unser Ziel den Einfluss einer Insulintherapie auf Biomarker der Atherosklerose, nicht jedoch auf Endpunkte wie Mortalität und Morbidität zu untersuchen. Gleichwohl sollte auf diese so wichtige Fragestellung kurz eingegangen werden und der derzeitige Stand der Untersuchungen dargestellt werden.

Mehrere Interventionsstudien haben sich bisher dieser Frage angenommen.

Die United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) schloss 3867 Patienten mit neu diagnostiziertem Typ-2-Diabetes ein. Ziel dieser großen Studie war herauszufinden, ob eine intensive Blutzuckerkontrolle das Risiko mikro- und makrovaskulärer Komplikationen verringern kann und inwieweit eine antidiabetische Therapie einer Anderen überlegen ist.

Hierbei konnte durch eine Verbesserung der Diabeteseinstellung das Risiko für mikrovaskuläre Folgeschäden deutlich reduziert werden (UKPDS 33 1998). Hinsichtlich der makrovaskulären Komplikationen wie zum Beispiel der Myokardinfarkthäufigkeit lies sich bei Patienten mit intensivierter Blutzuckereinstellung (Metformin, Sulphonyl-harnstoff oder Insulin) ebenfalls eine Tendenz zur Verringerung finden, aber der Einfluss auf kardiovaskuläre Endpunkte erreichte während des zehnjährigen Beobachtungszeitraumes keine statistische Signifikanz (UKPDS 33 1998). Einer der vermuteten Gründe könnte in der gewählten Studienpopulation liegen mit ausschließlich neu diagnostizierten Typ-2-Diabetikern

angesichts einer doch langen Progression von makrovaskulären Komplikationen und deswegen möglicher zu kurzer Beobachtungszeit.

Die Rolle von Insulin in der Atherogenese ist seit Jahren Gegenstand der Diskussion (Dandona 2002). Exogen zugeführtes Insulin wurde in der Literatur gelegentlich als potentiell schädliche Behandlung aufgeführt. In-vitro und epidemiologische Studien, die eine Assoziation der Hyperinsulinämie mit der koronaren Herzerkrankung und mit der Atherosklerose zeigten, wurden als Beweis aufgeführt, dass Insulin einen Atherogenese-fördernden und pro- inflammatorischen Effekt haben könne (Festa 1999, Kekalainen 1996, Stout 1991,1992 und 1996). In der UKPD Studie fand sich dagegen im Studienarm der Patienten mit Insulintherapie, trotz höherer Nüchtern-Insulinspiegel als in den anderen Behandlungsgruppen, keinerlei erhöhte Myokardinfarkhäufigkeit.

Die University Group Diabetes Program Studie (UGDP 1975), die 409 Patienten einschloss, untersuchte über einen Zeitraum von 13 Jahren den Einfluss einer Insulintherapie auf das kardiovaskuläre Risiko im Rahmen dreier Behandlungsarme (variable Insulingabe, fixe Insulingabe, Diät plus orale Plazebogabe). Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität sowie der Gesamtmortalität (Genuth 1996). Leider liegen zu dieser Studie keine Daten zum HbA<sub>1c</sub> der Patienten vor.

Die VACSDM Studie (Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type II Diabetes) untersuchte an 153 männlichen Studienteilnehmern die Effekte einer verbesserten Blutzuckereinstellung im Rahmen einer zwei Jahre dauernden Pilotstudie. Hierbei erhielten die Patienten in der Gruppe mit der intensivierten Therapie eine intensivierte Insulintherapie mit variablen Insulingaben. Trotz einer deutlichen Stoffwechselverbesserung (HbA<sub>1c</sub> -2,1%) zeigten sich keine Unterschiede in der Gesamt- als auch in der kardiovaskulären Mortalität (Abraira 1997).

Die DIGAMI Studie 1 und 2 (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) hatte ihren primären Fokus auf eine Akutintervention bei Patienten mit Diabetes, die wegen Verdacht auf akuten Myokardinfarkt klinischer Behandlung bedurften. Hierbei wurden aber auch die Langzeiteffekte einer intensivierten Insulintherapie untersucht. Patienten in der DIGAMI 1 Studie erhielten im Behandlungsarm während der Akutphase mit Verdacht auf Myokardinfarkt eine Insulininfusion über 24 h und anschliessend während der folgenden Monate eine

intensivierte Insulintherapie. Nach über drei Jahren konnte hierbei eine Reduktion der Gesamtmortalität um 11% bei diesen Hochrisikopatienten festgestellt werden. (Malmberg 1997).

Die DIGAMI 2 Studie sollte mehr Aufschluss über die Ursache dieser deutlichen Reduktion der Sterblichkeit bringen. Dafür wurden die Patienten in drei Behandlungsarme randomisiert. Die Patienten in Gruppe 1 und 2 erhielten eine Insulininfusion über 24h, die in der ersten Behandlungsgruppe aber zusätzlich eine sich unmittelbar anschließende intensiviertere Insulintherapie mit strengerer Blutglukosekontrolle. Patienten in Gruppe 2 und 3 erhielten nach den ersten 24 Stunden dazu im Gegensatz nur eine Standardtherapie nach Vorgabe des behandelnden Arztes. Die DIGAMI 2 Studie konnte die These einer Reduktion der Sterblichkeit durch eine akut begonnene und langfristig fortgeführte Insulingabe nicht bekräftigen. Die Mortalität sowie die Morbidität unterschied sich nicht signifikant in den drei Behandlungsgruppen. Allerdings konnte in der Gruppe, die eine intensiviertere Insulintherapie erhielt, keine bessere Blutglukoseeinstellung als in den anderen Gruppen im Behandlungszeitraum erreicht werden. Es lasse sich somit, so die Autoren, ein vorteilhafter Effekt nur durch eine Insulingabe unabhängig von einer besseren Blutglukoseeinstellung nicht feststellen (Malmberg 2005).

Eine Meta-Analyse von Huang et al. (2001) untersuchte anhand von randomisierten klinischen Interventionsstudien den Effekt einer Glukose senkenden Therapie wie auch einer Cholesterin- und Blutdruck senkenden Therapie auf die kardiovaskuläre Morbiditäts- und Mortalitätsrate von Typ-2-Diabetikern. Hierbei kommen die Autoren zu dem Schluss, dass eine verbesserte Blutglukoseeinstellung essentiell zur Vermeidung mikrovaskulärer Folgeerkrankungen ist, aber zur Reduzierung von makrovaskulären Folgen eine Senkung des Cholesterinsspiegels und des Blutdruckes nach heutigem Stand effektiver ist. Wie sehr eine Senkung der Blutglukosespiegel das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit Typ-2-Diabetes senken kann, bleibt unklar und bedarf weiterer größerer prospektiver Studien (Huang 2001).

## **1.7. Fragestellungen**

Klinische Untersuchungen über den Effekt einer Insulintherapie auf Inflammationsmarker der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sind rar.

Insbesondere prospektive Studien, die einen längeren Verlauf untersuchen, wurden bislang kaum durchgeführt.

Primär wurde im Rahmen unserer Studie eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage – sichtbar an einer signifikanten Reduktion des HbA<sub>1c</sub> und der Nüchtern-Blutglukose – durch die Umstellung auf eine intensiviertere Insulintherapie erwartet.

Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob die Verbesserung der Stoffwechsellage zu einer Reduktion von systemisch messbaren inflammatorischen Biomarkern der Atherosklerose führt.

Hierfür wurden Inflammations- und endotheliale Marker der Atherosklerose sowie Gerinnungsfaktoren und Marker der Fibrinolyse über einen Zeitraum von 6 Monaten untersucht.

Gleichzeitig sollten während der Studie außer an dem Insulinregime keine Änderungen an der bestehenden Medikation vorgenommen werden, um vorhandene Einflüsse möglichst auszuschliessen.

Unsere Fragestellung war:

- Haben eine neu begonnene Insulintherapie und eine damit verbundene signifikante Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage einen Einfluss auf die im Serum gemessenen Konzentrationen von hs-CRP, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin, MMP-9, IL-6, Homocystein, Lp(a), D-Dimer, Fibrinogen, PAI-1, Faktor VII und Faktor VIII?
- Sind die Konzentrationen der gemessenen inflammatorischen Biomarker zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses – verglichen mit Daten aus prospektiven Untersuchungen bei gesunden Probanden gleichen Alters – erhöht ?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Rekrutiert wurden 17 Patienten der Diabetes- Ambulanz und der Schwerpunktstation Endokrinologie- Diabetologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Typ-2-Diabetes unter Therapie mit oralen Antidiabetika, die auf eine Insulintherapie umgestellt werden sollten.

Einschlusskriterien :

Patienten mit Typ-2-Diabetes, bisher behandelt mit oraler antidiabetischer Therapie mit nun notwendig gewordener Umstellung auf eine Insulintherapie wegen entweder ungenügender Stoffwechseleinstellung ( $\text{HbA}_{1c} > 7,0\%$  trotz intensivierter oraler antidiabetischer Medikation bzw. Kombinationstherapie ) oder Unverträglichkeit der oralen Medikation.

Ausschlusskriterien:

BMI  $> 40 \text{ kg/m}^2$ , akute schwere Erkrankungen insbesondere jegliche akute Entzündung, Leberinsuffizienz, Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, M.Crohn, Linksherzinsuffizienz, Myokardinfarkt oder instabile Angina pectoris in den letzten 6 Monaten vor Studieneinschluss und Beginn einer Medikation mit ACE-Hemmer, Statinen oder  $\beta$ -Blocker in den letzten 6 Wochen.

Die Studie wurde nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Die Studienteilnehmer wurden nach den Vorgaben der Ethikkommission der LMU München mündlich und schriftlich eingehend über Ziel und Ablauf der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis mit Unterschreiben des Aufklärungs- und Einwilligungsbogens. Der Zeitraum der Untersuchung betrug 16 Monate (September 2003 bis Januar 2005).

## **2.2. Studiendesign**

Die Studie wurde als unkontrollierte und offene Pilotstudie in einem prospektivem Design durchgeführt. Die Datendokumentation wurde mittels standardisierter Fragebögen durchgeführt.

Bei jeder Visite erfolgte neben einer Blutentnahme und Urinprobe eine ausführliche Anamnese mit Alter, Geschlecht, Diabetesdauer, Körpergröße, Körpergewicht, Blutdruck, Body-Mass-Index und Risikofaktoren (Nikotinkonsum, Dyslipidämie, Arterielle Hypertonie) sowie eine körperliche Untersuchung zum Ausschluss akuter Entzündungen.

Die Dokumentation diabetischer Begleiterkrankungen bestand aus anamnestischen Angaben sowie aus aktuell erhobenen Befunden.

Blut wurde zweimal im Abstand von einer Woche unter der bisherigen oralen antidiabetischen Therapie abgenommen und sechs Monate nach Umstellung auf die Insulintherapie. Eine Urinuntersuchung auf Albuminurie erfolgte bei jeder Visite.

Die Feststellung diabetischer Folgeerkrankung der Augen erfolgte entsprechend der Patientenanamnese sowie aufgrund von fachärztlicher ophthalmologischer Untersuchung und umfasste das Kriterium diabetische Retinopathie.

Eine diabetische Nephropathie wurde nach Ausschluss von Glomerulonephritis, interstitieller Nephritis, Zystennieren und Harnwegsinfekt an Hand einer Mikroalbuminurie von mehr als 2,0 mg/dl mittels mindestens zwei positiver Bestimmungen diagnostiziert.

Die Feststellung einer diabetischen Polyneuropathie basierte auf dem Vorkommen von Parästhesien und sensorischen- sowie sensiblen Nervenausfallerscheinungen.

Beim diabetischen Fußsyndrom wurden der neuropathische Fuß (warm, trocken, rosig mit Hyperkeratosen, Krallenzehen, schmerzlosen Ulzera, nachweisbaren Fußpulsen, herabgesetzter Tiefensensibilität und Schmerzwahrnehmung), der ischämische Fuß infolge arterieller Verschlusskrankheit (kühl, livide Verfärbung,

Claudicatio intermittens, Ulzera an den Akren, keine Fußpulse, erhaltene Sensibilität) und die Kombination aus beiden Typen beschrieben.

Ein arterieller Hypertonus wurde konstatiert bei Blutdruckwerten über 135 mmHg systolisch bzw. 85 mmHg diastolisch, gemessen nach mindestens 5 Minuten in Ruhe oder wenn der Patient bereits unter antihypertensiver Therapie stand.

Die Beurteilung des Kriteriums Makroangiopathie umfasste anamnestische Angaben, Ergebnisse der klinischen Untersuchungen und Daten aus apparativer Diagnostik (Dopplersonographie, Ruhe-EKG, Belastungs-EKG, Myokardszintigraphie und invasive Diagnostik z.B. durch Koronarangiographie). Dokumentiert wurden die Ereignisse transitorische ischämische Attacke (TIA), Apoplex, Angina pectoris und Myokardinfarkt in der Vorgeschichte des Patienten sowie das Vorliegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK).

Eine Hyperlipoproteinämie wurde festgestellt bei überschrittenen Grenzwerten für Gesamt-Cholesterin (> 200 mg/dl) LDL-Cholesterin (>100 mg/dl), Triglyzeride (> 200 mg/dl nüchtern) oder wenn der Patient bereits Lipidsenker einnahm.

Die eingenommenen Medikamente wurden erfasst, insbesondere die bisherige orale antidiabetische Therapie sowie Statine, ASS, ACE- Hemmer, Ca-Antagonisten,  $\beta$ -Blocker und AT-2 Rezeptorblocker. Es wurden während des Studieneinschlusses keine Interventionen bezüglich des Medikamentenregimes durchgeführt.

Ein Insulinschema wurde nicht vorgegeben, wurde aber, mit Anzahl der gespritzten Einheiten, dokumentiert.

## **2.3. Analytische Methoden**

### **2.3.1. Blutentnahme und Probenaufbereitung**

Venöses Blut wurde morgens im Nüchternzustand entnommen. Die Laborparameter wurden in den klinikeigenen Labors bestimmt.

Die Parameter Hämoglobin, HbA<sub>1c</sub>, Blutglukose, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, Kreatinin, Fibrinogen sowie Albumin im Urin wurden sofort nach Probenentnahme im Zentrallabor analysiert.

Um Verfahrensfehler zu reduzieren, erfolgte die Messung aller experimentellen Parameter in einem Ansatz am Ende der Studie aus tiefgefrorenen Plasmaproben.

### **2.3.2. hs-CRP**

Die Bestimmung des hs-CRP erfolgte mit einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay der Firma DRG International, Inc. (USA).

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, versehen mit einem fixierten, für CRP spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper, werden Standardreihen und Probenmaterial und ein weiterer nicht-gebundener enzymmarkierter anti-CRP - Antikörper hinzugefügt. Während einer 45 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bindet das in der Probe enthaltene CRP an den an die Mikrotiterplatte fixierten Antikörper und gleichzeitig an die enzymmarkierten löslichen anti-CRP -Antikörper. Nicht gebundene Antikörper werden herausgewaschen und eine aus Tetramethylbenzidin bestehende Reagenz hinzugegeben, wodurch sich nach 20 Minuten Inkubationszeit ein blauer Farbton entwickelt.

Nach dem Hinzufügen einer Stopplösung wird die Farbintensität, die dem gebundenen CRP direkt proportional ist, bei 450 nm photometrisch gemessen (DRG Instruments CRP HS ELISA 2003).

### **2.3.3. IL-6**

Die Bestimmung des hs-Interleukin-6 erfolgte mit dem Testkit Quantikine® HS der Firma R&D Systems. Bei dem Verfahren handelte es sich um ein high sensitives (hs) quantitatives Sandwich-Enzym-Immunoassay.

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, versehen mit einem fixierten, für IL-6 spezifischen monoklonalen Antikörper, werden Standardreihen und Probenmaterial hinzugefügt. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bindet das enthaltene IL-6 an den an die Mikrotiterplatte fixierten Antikörper. Nach Herauswaschen der ungebundenen Substanzen wird ein enzym-gebundener polyklonaler Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet während einer sechsständigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an das fixierte IL-6. Nicht gebundene Antikörper werden herausgewaschen und ein Substrat für das Enzym hinzugefügt. Nach einer 60 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird eine Amplifizier Lösung hinzugefügt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Amplifikationssystem dephosphoriert eine alkalische Phosphatase die reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zu reduziertem NADH. Dieses NADH dient als Cofaktor für einen, von einem Alkohol-Dehydrogenase und Diaphorase Enzym System (Amplifizier) geleiteten Redox-Zyklus. In dieser Reaktion, katalysiert von dem Enzym Diaphorase, reduziert NADH ein Tetrazolium Salz (INTviolett).

Es entsteht eine intensive Farbe und NAD<sup>+</sup>. Die entstehende Farbe ist dem gebundenen IL-6 direkt proportional und wird 30 Minuten später und nach dem Hinzufügen einer Stopplösung gemessen. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,02pg/ml (Quantikine® HS Human IL-6 Immunoassay, R&D Systems 2004).

### **2.3.4. MMP-9, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin**

Die Bestimmung von MMP-1 und MCP-1 erfolgte mit dem Testkit Quantikine® der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA), die Bestimmung von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin mit dem Testkit Parameter® der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA).

Bei beiden Verfahren handelt es sich um quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassays. Das für MMP-9 geschilderte Testprinzip gilt analog für die weiteren analysierten Parameter.

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, versehen mit einem fixierten, für MMP-9 spezifischen monoklonalen Antikörper, werden Standardreihen und Probenmaterial hinzugefügt. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur bindet das in der Probe enthaltene MMP-9 an den an die Mikrotiterplatte fixierten Antikörper. Nach Herauswaschen der ungebundenen Substanzen wird ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet während einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an einer anderen Stelle als der monoklonale Antikörper an das fixierte MMP-9. Nicht gebundene Antikörper werden herausgewaschen und ein Substrat für das Enzym hinzugefügt.

Die entstehende Farbe ist dem gebundenen MMP-9 direkt proportional und wird 30 Minuten später und nach dem Hinzufügen einer Stopplösung gemessen (Quantikine® Human MMP-9 Immunoassay, R&D Systems 2003).

### **2.3.5. C-Peptid**

Mit Hilfe eines kompetitiven Radioimmunassays wurde C-Peptid beim nüchternen Patienten erfasst. Unmarkiertes Antigen (Patienten-Serum bzw. Standards), radioaktiv markiertes Antigen und ein spezifisches Antiserum werden in definierten Mengen in einem Röhrchen gemischt und inkubiert.

Die radioaktiven markierten und unmarkierten Antigene konkurrieren während der Inkubation um die begrenzte Anzahl der Antikörper-Bindungsstellen. In dieser Reaktion bilden markiertes und unmarkiertes Antigen mit dem Antiserum Antigen-Antikörperkomplexe. Nach der Inkubation wird die Trennung von freiem und ungebundenem C-Peptid mit Polyäthylenglykol (PEG) durchgeführt. Das entstandene Immunpräzipitat wird zentrifugiert.

Anschließend wird mit dem Überstand das ungebundene freie Antigen dekandiert oder abgesaugt. Das im Röhrchen verbliebene Präzipitat wird in einem Gamma-Counter gemessen. Mit den gemessenen Standardwerten wird eine Eichkurve erstellt, aus der die Werte der Patientenserum ermittelt werden können (Hoekstra 1982).

### 2.3.6. HbA<sub>1c</sub>

Die Gesamt-Hb- und HbA<sub>1c</sub>-Konzentrationen wurden nach der Hämolyse der antikoagulierten Vollblutprobe ermittelt. Das Gesamt-Hb wird hierbei kolorimetrisch gemessen. HbA<sub>1c</sub> wird dagegen immunturbidimetrisch bestimmt (Roche Diagnostics, Cobras Integra 700, Mannheim). Das Verhältnis zwischen beiden Konzentrationen ergibt das endgültige HbA<sub>1c</sub> -Ergebnis [HbA<sub>1c</sub> (%)].

Zuerst wird die antikoagulierte Vollblutprobe automatisch mit HbA<sub>1c</sub> Hemolysis Reagent in der Vorverdünnungsküvette hämolysiert. Die Erythrozyten werden dabei durch niedrigen osmotischen Druck lysiert. Das freigesetzte Hb wird durch Pepsin proteolytisch abgebaut, wodurch die N-terminalen Strukturen für den Immunoassay besser zugänglich werden. Außerdem werden die Hämanteile für den Hb-Test oxidiert. Das Gesamt-Hb des Hämolysats wird anhand einer cyanidfreien kolorimetrischen Methode, die auf der Bildung eines braungrünen Chromophors (alkalisches Hämatin D-575) in einer alkalischen Detergenzlösung basiert, bestimmt (Zander 1984).

Die Farbintensität ist proportional zur Hb-Konzentration der Probe und wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 552 nm bestimmt. Das Testergebnis wird anhand eines konstanten Faktors berechnet, der sich aus dem Primärkalibrator Chlorhäm-in ergibt.

HbA<sub>1c</sub> wird danach unter Verwendung von monoklonalen an Latexpartikel gebundenen Antikörpern ermittelt. Die Antikörper binden die N-terminalen Fragmente des HbA<sub>1c</sub>. Die restlichen freien Antikörper werden mit einem synthetischen Polymer, das mehrere Kopien der N-terminalen Struktur des HbA<sub>1c</sub> trägt, agglutiniert. Die Trübungsänderung verhält sich umgekehrt proportional zur Menge der gebundenen Glycopeptide und wird turbidimetrisch bei 552 nm gemessen. Für die Kalibration wird ein synthetisches Polypeptid mit der N-terminalen Struktur von HbA<sub>1c</sub> verwendet (Wolf 1984).

Das Endergebnis wird als HbA<sub>1c</sub> in Prozent ausgedrückt und errechnet sich aus dem Verhältnis HbA<sub>1c</sub> / Hb wie folgt:

Protokoll 1 (gemäß IFCC):  $\text{HbA}_{1c} (\%) = \text{HbA}_{1c} / \text{Hb} \times 100$

Protokoll 2 (gemäß DCCT/NGSP):  $\text{HbA}_{1c} (\%) = (\text{HbA}_{1c} / \text{Hb}) \times 87,6 + 2,27$

### **2.3.7. Gesamt-Cholesterin**

Die Bestimmung des Gesamt-Cholesterin erfolgte mit Hilfe eines enzymatischen Farbtestes (Roche Diagnostics, Cobras Integra 800, Mannheim).

Bei der Hydrolyse von Cholesterinestern durch Cholesterinesterase entstehen Fettsäuren und freies Cholesterin. Dieses wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminoantipyrin und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff. Die Farbintensität des gebildeten Farbstoffs ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 520 nm bestimmt (Allain 1974, Trinder 1969).

### **2.3.8. HDL - Cholesterin**

Die Bestimmung von HDL-Cholesterin erfolgte ebenfalls mittels eines homogenen enzymatischen Farbtestes (Roche Diagnostics, Cobras Integra 800, Mannheim).

In Gegenwart von Magnesiumsulfat und Dextransulfat werden wasserlösliche Komplexe mit LDL, VLDL und Chylomikronen gebildet, die gegen PEG-modifizierte Enzyme resistent sind. Mit Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase, mit PEG an die Aminogruppen (ca. 40%) gebunden, wird die Konzentration von HDL-Cholesterin enzymatisch bestimmt. Die Cholesterinester werden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird in Gegenwart von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu  $\Delta^4$ -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Die Farbintensität des gebildeten blauen Chinoniminfarbstoffs ist direkt proportional zur HDL-Cholesterinkonzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 583 nm bestimmt (Sugiuchi 1995).

### 2.3.9. LDL-Cholesterin

LDL- Cholesterin wurde nach der Friedewald-Formel berechnet (Friedewald 1972). Das Gesamt-Cholesterin muss hierbei kleiner 450 mg/dl und die Triglyzeridkonzentration kleiner 400 mg/dl betragen.

LDL-Cholesterin = Gesamt- Cholesterin – HDL-Cholesterin – Triglyzeride / 5

### 2.3.10. Triglyzeride

Die Bestimmung der Triglyzeride erfolgte enzymatisch, kolorimetrisch mit Glycerolphosphatoxidase und 4-Aminophenazon (Roche Diagnostics, Cobras Integra 800, Mannheim).

Triglyzeride werden durch Lipoproteinlipase (LPL) zu Glycerol und Fettsäuren hydrolysiert. Das Glycerol wird danach durch ATP in einer durch Glycerolkinase (GK) katalysierten Reaktion zu Glycerol-3-phosphat phosphoryliert. Die Oxidation von Glycerol-3-Phosphat wird durch Glycerolphosphatoxidase (GPO) katalysiert, wobei Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entstehen. In Anwesenheit von Peroxidase (POD) reagiert Wasserstoffperoxid mit der oxidativen Bindung von 4-Chlorphenol und 4-Aminophenazon zu einem roten Chinoniminfarbstoff, der bei 512 nm gemessen wird. Die Absorptionzunahme ist direkt proportional zur Triglyzeridkonzentration in der Probe (Fossati 1982, McGowan 1983).

### 2.3.11. Blutglukose

Die Blutglukose wurde enzymatisch mit dem Enzym Hexokinase analysiert (Roche Diagnostics, Cobras Integra 800, Mannheim).

Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glucose durch ATP, wobei Glucose-6-phosphat und ADP entstehen. Anschließend wird ein zweites Enzym, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, als Katalysator der Oxidation von Glucose-6-phosphat durch NAD<sup>+</sup> genutzt, wobei NADH gebildet wird. Die Konzentration des gebildeten NADH ist direkt proportional zur Glucosekonzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 340 nm bestimmt (Neeley 1972).

### **2.3.12. Kreatinin**

Kreatinin wurde quantitativ mit Hilfe einer kinetischen Jaffé - Reaktion bestimmt (Roche Diagnostics, Cobras Integra 800, Mannheim).

In alkalischer Lösung reagiert Kreatinin mit Pikrat und bildet ein gelbrotes Addukt.

Die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes (Farbintensität) ist direkt proportional zu der Kreatininkonzentration in der Probe. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 512 nm bestimmt (Jaffé 1886, Bowers 1980).

### **2.3.13. Albumin**

Albumin im Urin wurde quantitativ im Spontanurin, vorzugsweise im ersten Morgenurin, mittels Immunturbodimetrie bestimmt (Roche Diagnostics, Cobras Integra 700, Mannheim).

Hierbei bildet Albumin mit einem spezifischen Antiserum einen Niederschlag, der turbodimetrisch bei 340 nm bestimmt wird (Gerbaut 1987).

### **2.3.14. Lipoprotein (a)**

Die Messung des Lp(a) erfolgte durch einen automatisierten turbodimetrischen Immunassay (Roche Diagnostics, Hitachi 911, Mannheim)

### **2.3.15. Fibrinogen**

Fibrinogen wurde koagulometrisch mit photooptischer Detektion mit der Methode nach Clauss bestimmt. Hierbei wird Citrat-Plasma mit einem großen Überschuß an Thrombin zur Gerinnung gebracht. Nach Bestimmung der Gerinnungszeit wird anhand einer Eichkurve die Konzentration bestimmt (Multifibren U, Dade Behring GmbH, Marburg 2003; Amax CS 190).

### **2.3.16. D- Dimer**

Mit einem vollautomatischen Latex-Immunoassay (HemosIL, Instrumentation Laboratory, Lexington, USA) wurde D- Dimer quantitativ bestimmt. Das verwendete D- Dimer Latex Reagenz ist eine Suspension aus Polystyren-Latexpartikeln einheitlicher Größe, die mit monoklonalen Antikörpern, die hochspezifisch für D- Dimer –haltige Fibrinolyseprodukte sind, beschichtet sind. In Anwesenheit von D- Dimer im Plasma agglutinieren die mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Latexpartikeln. Der Grad der Agglutination nimmt proportional zur D- Dimer – Konzentration der Probe zu. Die Bestimmung erfolgt durch die Messung der durch die Agglutination bedingten Abnahme der Lichtdurchlässigkeit bei 405 nm (Newman 1992).

### **2.3.17. Faktor VII**

Die Ermittlung der Faktor VII - Aktivität erfolgte auf Basis einer modifizierten Thromboplastinzeit- Bestimmung (TPZ, Quick). Verdünntes Patientenplasma wurde mit einem immunologisch erzeugtem Faktor VII- Mangelplasma gemischt. Die Verkürzung der Gerinnungszeit ist proportional zum Gehalt (Aktivität %) von Faktor VII in der zugesetzten Probe. Die Menge wurde über eine Kalibrationskurve quantifiziert (Instrumentation Laboratory, Lexington, USA 2004).

### **2.3.18. Faktor VIII**

Die Ermittlung der Faktor VIII - Aktivität erfolgte auf Basis einer modifizierten aktivierten partiellen Thromboplastinzeit- Bestimmung (aPTT). Verdünntes Patientenplasma wurde mit einem immunologisch erzeugtem Faktor VIII- Mangelplasma gemischt. Die Verkürzung der Gerinnungszeit ist proportional zum Gehalt (Aktivität %) von Faktor VIII in der zugesetzten Probe. Die Menge wurde über eine Kalibrationskurve quantifiziert (Instrumentation Laboratory, Lexington, USA 2004).

### **2.3.19. Homocystein**

Die Bestimmung von Homocystein erfolgte mittels kompetitivem Immunoassay mit direktem Chemilumineszenz-Verfahren.

Das durch ein Reduktions- und Enzymreagenz zu S- Adenosyl-homocystein (SAH) umgewandelte Homocystein der Patientenprobe konkurriert mit kovalent an paramagnetische Partikel gebundenem SAH um eine begrenzte Menge Acridiniumester-markiertes Anti- SAH. Über das umgekehrt proportionale Verhältnis zwischen der Homocystein - Menge und den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten werden die Proben ausgewertet (ADVIA Centaur HCY-Test, Bayer HealthCare 2003).

### **2.3.20. PAI-1**

Die PAI-1 Aktivität im Plasma wurde mit einem Bio- Immunoassay bestimmt.

Verdünntes Testplasma wird hierbei in Mikrotitervertiefungen, die mit rekombinantem t-PA beschichtet sind, inkubiert. Ausschließlich aktiver PAI-1 bindet an das t-PA und wird an die Festphase fixiert. Nach einem Waschschrift wird das Immunkonjugat, ein Peroxidase -gekoppelter monoklonaler Maus-Anti-PAI-1-Antikörper, zugegeben und bindet an ein definiertes Epitop des immobilisierten PAI-1. Nach einem erneuten Waschschrift wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) die Bildung eines blauen Farbstoffes induziert. Durch Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure entsteht eine Gelbfärbung, deren Intensität direkt proportional zur Aktivität des humanen PAI-1 in der Probe ist (Declerck 1988, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen 2005).

Die Bestimmung von PAI-1 Antigen erfolgte mit Hilfe eines Ein-Stufen-Sandwich-Elisa.

Hierbei wird ein Immunkonjugat, ein Peroxidase- gekoppelter, monoklonaler Anti-PAI-1-Antikörper, in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert, die mit einem weiteren monoklonalen Anti-PAI-1-Antikörper beschichtet sind. Anschließend wird sofort verdünnte Probe zugegeben, worauf die Immunreaktion startet. PAI-1 Ag bindet über ein definiertes Epitop an die Festphasen-gebundenen monoklonalen

Anti-PAI-1 Antikörper und bindet den zweiten Peroxidase- gekoppelten monoklonalen Anti-PAI-1 Antikörper über ein weiteres definiertes Epitop. Nach einem Waschschrift wird durch Zugabe des Peroxidasesubstrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) die Bildung eines blauen Farbstoffes induziert. Durch Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure entsteht eine Gelbfärbung, deren Intensität direkt proportional zur Aktivität des humanen PAI-1 Ag in der Probe ist (Declerck 1988, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen 2004).

## **2.4. Statistik**

Falls im Text nicht anders angegeben, erfolgte die Angabe der Ergebnisse nach Überprüfung auf Normalverteilung als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Zur Durchführung der statistischen Analysen wurde die Computersoftware *SPSS 12.0 for Windows* (SPSS, Chicago, IL, USA) angewandt.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte dabei mit dem Kolmogorov-Smirnov und dem Shapiro-Wilk-Test, die statistischen Analysen unter Verwendung des Wilcoxon matched-pairs signed-rank Testes. Unterschiede mit einem  $p$ -Wert kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Patienten

17 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (10 Männer, 7 Frauen) wurden in die Studie eingeschlossen und von oraler antidiabetischer Medikation auf eine Insulintherapie eingestellt. Alle Patienten tolerierten die Umstellung der Therapie problemlos. Es gab keine Studienabbrecher.

Das mittlere Alter der Patienten betrug 66 Jahre (Range 51-76; SD 7,7).

- mittleres Alter der Männer : 65 Jahre $\pm$ 8,5 (51-76)
- mittleres Alter der Frauen : 69 Jahre $\pm$ 5,1 (59-73)

Das mittlere Körpergewicht der Patienten betrug zu Beginn der Studie 82,7 kg $\pm$ 16,7 (58-124) mit einem mittleren Body-Mass-Index (BMI) von 28,7 kg/m<sup>2</sup> $\pm$ 4,3 (22,9-37,2).

Obwohl bei 13 Patienten nach sechsmonatiger Insulintherapie eine Gewichtszunahme festgestellt wurde, konnten 4 Patienten eine deutliche Abnahme ihres Körpergewichts mittels Diät und Bewegung erreichen, so dass sich dadurch insgesamt keine signifikante Erhöhung des KGs als auch des BMI feststellen lässt. Der Anteil der Patienten mit Normalgewicht (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>) betrug 24 %, wohingegen erwartungsgemäß 76 % der Patienten übergewichtig waren. Hierbei betrug der Anteil der Patienten mit Adipositas Grad I (BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) 35 % und bei 41 % der Patienten lag eine Adipositas Grad II und III vor mit einem BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> vor.

Im Durchschnitt erhielten die Patienten eine mittlere Insulindosis von 40,5 IU/d nach 24 Wochen.

Die Patienten-Charakteristika sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Charakteristika ( $\bar{x} \pm SD$ )	Baseline	Nach 6 Monaten
Alter ( Jahre )	66	
Geschlecht weiblich (%)	41	
Diabetesdauer ( Jahre )	11 $\pm$ 8	
HbA1c (%)	8,1 $\pm$ 1,1	7,5 $\pm$ 0,7
Body-Mass Index ( kg/m <sup>2</sup> )	28,7 $\pm$ 4,3	29 $\pm$ 3,8
Adipositas Grad I (BMI 25-30 kg/m <sup>2</sup> in%)	35	35
Adipositas Grad II-III ( BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> in%)	41	41
Blutdruck ( mmHg )		
Systolisch	133 $\pm$ 14	136 $\pm$ 11
Diastolisch	82 $\pm$ 9	81 $\pm$ 6
Art. Hypertonie (%)	65	65
Nikotinkonsum (%)	11,7	11,7
Lipide		
HDL-Cholesterin (mg/dl)	53 $\pm$ 15	56 $\pm$ 18
LDL -Cholesterin (mg/dl)	93 $\pm$ 30	108 $\pm$ 30
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	182 $\pm$ 36	196 $\pm$ 36
Triglyzeride (mg/dl)	177 $\pm$ 86	158 $\pm$ 89
Dyslipidämie (%)	47	47
Nierenfunktion		
Mikroalbuminurie (%)	41	41
Serum-Kreatinin (mg/dl)	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2
Dialyse (%)	0	0
Medikation		
ASS (%)	29	29
Statin (%)	71	71
ACE-Hemmer bzw.AT2-Blocker (%)	71	71
Beta-Blocker (%)	59	59

**Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Studienpatienten:**

Dargestellt sind die klinischen Charakteristika der Studienteilnehmer zu Anfang der Untersuchung und nach sechs Monaten. Die Medikation umfasst nur die für die Untersuchung als relevant eingestuften Stoffklassen.

Tabelle 2 zeigt die orale antidiabetische Therapie der Patienten vor der Umstellung auf die Insulintherapie. 70 % der Patienten hatten als antidiabetische Therapie Metformin entweder als Monotherapie (12%) oder in Kombination mit einem Sulphonylharnstoff (35 %). Am zweithäufigsten erhielten die Patienten die Kombination eines Metformins mit einem Glinid (17 %). Die neueste Stoffklasse der

oralen Antidiabetika, die Glitazone, erhielten nur 12 % der Teilnehmer.

<b>Medikation nach Einzelstoffen</b>	
Metformin	70 %
Sulphonylharnstoff	59 %
Glinid	35 %
Glitazon	12 %
<b>Medikamente nach Stoffgruppen</b>	
<b>Monotherapie mit</b>	
Metformin	12%
Sulphonylharnstoff	12 %
Glinid	6 %
Glitazon	0 %
<b>Kombinationstherapie mit</b>	
Metformin/Glinid	17 %
Metformin/Sulphonylharnstoff	35 %
Metformin/Glinid/Glitazon	6 %
Sulphonylharnstoff/Glinid	6 %
Sulphonylharnstoff/Glitazon	6 %

**Tabelle 2: Orale antidiabetische Therapie vor Umstellung.**

Dargestellt ist die orale antidiabetische Medikation in Prozent gegliedert nach den Einzelstoffen und die individuellen Therapieschemata nach Stoffgruppen in Prozent.

Die Diabetischen Folge- und Begleiterkrankungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

<b>Charakteristika</b>	<b>Baseline (%)</b>
Arterielle Hypertonie	65 %
Diabetische Nephropathie	41,2 %
KHK	23,5 %
Z.n. Myokardinfarkt	17,6 %
Diabetische Retinopathie	17,6 %
Diabetische Polyneuropathie	17,6 %
Chronische Niereninsuffizienz	6 %
Z.n. Apoplex	6 %
pAVK	6 %

**Tabelle 3: Diabetische Folge- und Begleiterkrankungen.**

Dargestellt sind die Folge- und Begleiterkrankungen der Patienten festgestellt durch Anamnese oder bei Vorliegen entsprechender Befunde im Klinik-eigenen Dokumentationssystem

-Ein arterieller Hypertonus wurde konstatiert bei Blutdruckwerten über 135 mmHg systolisch bzw. 85 mmHg diastolisch, gemessen nach mindestens 5 Minuten in Ruhe oder wenn der Patient bereits unter antihypertensiver Therapie stand.

- Eine diabetische Nephropathie wurde an Hand einer Mikroalbuminurie von mehr als 2,0 mg/dl mittels mindestens zwei positiver Bestimmungen diagnostiziert.
- Die Feststellung einer diabetischen Polyneuropathie basierte auf dem Vorkommen von Parästhesien und sensorischen- sowie sensiblen Nervenfallserscheinungen.
- pAVK (periphere Arterielle Verschlusskrankheit) wurde diagnostiziert an Hand folgender Kriterien: (Haut kühl mit livider Verfärbung, Claudicatio intermittens, Ulzera an den Akren, keine Fußpulse, erhaltene Sensibilität)

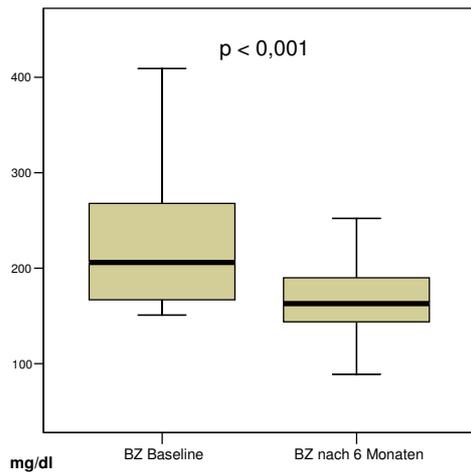
### 3.2. Stoffwechselfparameter

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der Stoffwechselfparameter vor Beginn der Studie und sechs Monate nach Umstellung auf eine Insulintherapie.

Tabelle 4 <b>Stoffwechselfparameter</b>			
	Baseline	6 Monate unter Insulintherapie	p ( 0 + 6 Mon.)
HbA1c (%)	8,1 (6,4 -10,5)	7,5 (6,3 – 9,0)	<b>0,019</b>
BZ nüchtern (mg/dl)	223 (151-409)	165 (89-252)	<b>&lt;0,001</b>
basales C-Peptid (ng/ml)	4,3 (1,7-7,7)	2,9 (0,3-9,9)	<b>0,004</b>
Albumin im Urin (mg/dl)	18,4 (0,7-142,0)	22,3 (0,7-129,0)	0,173
BMI (kg /m <sup>2</sup> )	28,7 (22,9-37,2)	29,0 (23,7-35,3)	0,214

Erwartungsgemäß verbesserte sich die Blutglukoseeinstellung der Patienten durch die Insulintherapie im Laufe der sechs Monate Beobachtungszeitraum.

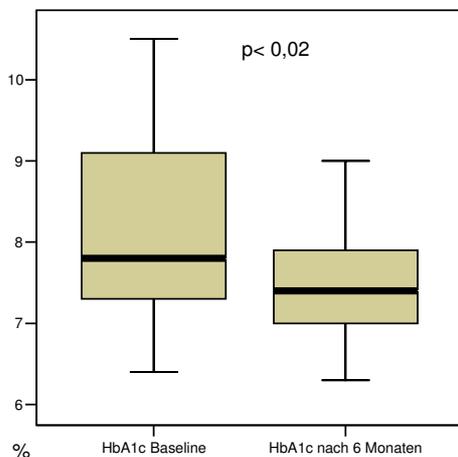
Die Nüchternblutglukose sank hochsignifikant um 26,2 % (58,5 mg/dl) von 223,5 mg/dl±68,3 auf 165,0 mg/dl±42,4 (p < 0,001).



**Abb.8: Baseline - Konzentration der Nüchtern -Blutglukose (BZ) und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

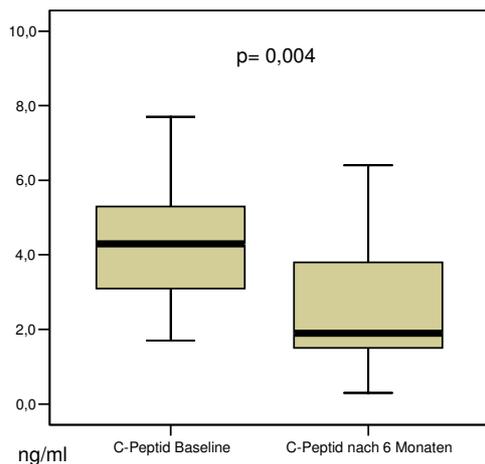
Das HbA<sub>1c</sub> sank von 8,1 % $\pm$ 1,1 auf 7,5 % $\pm$ 0,7 nach sechsmonatiger Insulintherapie ( $p = 0,019$ ).



**Abb.9: Baseline - Konzentration des HbA<sub>1c</sub> und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme ( $p < 0,02$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

Das Nüchtern-C-Peptid nahm um 32,5 % (1,4 ng/ml) von 4,3 ng/ml $\pm$ 1,6 auf 2,9 ng/ml $\pm$ 2,3 ab ( $p = 0,004$ ).



**Abb.10: Baseline - Konzentration des Nüchtern- C-Peptid und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme ( $p < 0,004$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

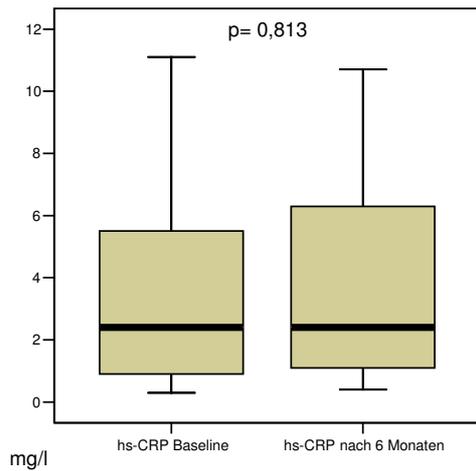
Eine Mikroalbuminurie fand sich bei 41 % der Patienten. Die Insulintherapie hatte weder einen Einfluss auf die Albuminkonzentration im Morgen-Urin der Patienten noch auf das Lipidprofil der Patienten.

### **3.3. Inflammationsparameter**

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der Inflammationsmarker vor Beginn der Studie und sechs Monate nach Umstellung auf eine Insulintherapie.

Tabelle 5 <b>Inflammationsparameter</b>			
	Baseline	6 Monate unter Insulintherapie	p ( 0 + 6 Mon.)
hs-CRP (mg/l)	3,6 (0,3-11,1)	4,2 (0,4-14,3)	0,813
IL-6 (pg/ml )	5,6 (0,8-34,5)	4,4 (0,8-27,2)	0,468
Homocystein ( $\mu$ mol/l)	13,1 (8,2-20,7)	13,4 (8,5-21,4)	0,586
Lp(a) (mg/dl)	21,4 (0,0-157,0)	21,2 (0,0-161)	0,705

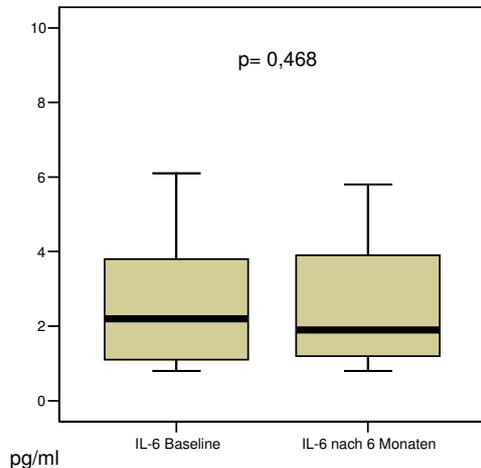
Die mittlere CRP-Konzentration nahm um 0,6 mg/l (14,3 %) während des Studienzeitraumes zu, wobei die Zunahme statistisch nicht signifikant war ( $p = 0,813$ ). Zu Anfang der Studie betrug die CRP-Konzentration  $3,6 \text{ mg/l} \pm 3,2$ , nach sechsmonatiger Insulintherapie  $4,2 \text{ mg/l} \pm 4,1$ .



**Abb.11: Baseline - Konzentration des high- sensitiven C-reaktiven Proteins ( hs-CRP ) und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine nicht-signifikante Zunahme (  $p < 0,813$  ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

Im Gegensatz hierzu nahm die Konzentration von IL-6 statistisch nicht-signifikant um 21,4 % ( 1,2 pg/ml ) von 5,6 pg/ml $\pm$ 9,8 auf 4,4 pg/ml $\pm$ 6,7 ab (  $p=0,468$  ).



**Abb.12: Baseline - Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine nicht-signifikante Abnahme (  $p < 0,468$  ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

Die Konzentrationen von Lp(a) ( 21,4 mg/dl $\pm$ 36,4 vs. 21,2 mg/dl $\pm$ 37,9 ,  $p= 0,705$  ) und von Homocystein ( 13,1  $\mu$ mol/l $\pm$ 3,8 vs. 13,4  $\mu$ mol/l $\pm$ 3,6 ,  $p= 0,586$  ) blieben von der Insulineinstellung unbeeinflusst.

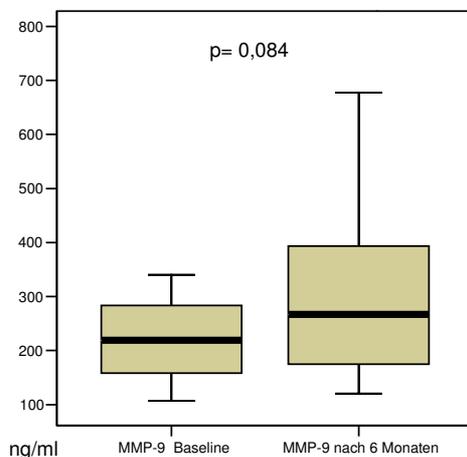
### 3.4. Endotheliale Marker

Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte der untersuchten endothelialen Marker vor Beginn der Studie und sechs Monate nach Umstellung auf eine Insulintherapie.

Tabelle 6 Endotheliale Marker			
	Baseline	6 Monate unter Insulintherapie	p ( 0 + 6 Mon.)
MMP-9 (ng/ml)	252 (106,7-624,9)	333 (120,6-841,8)	0,084
MCP-1 (pg/ml)	418 (223,7-1479,8)	483 (226-1913,6)	<b>0,049</b>
E-Selectin (ng/ml)	66,3 (29,9-146,1)	65,5 (22,3-137,4)	0,435
ICAM-1 (ng/ ml)	311 (180,8-787,6)	310 (187,3-795,5)	0,831
VCAM-1 (ng/ml)	800 (557,5-1483,2)	834 (525,8-1795,9)	0,492

#### 3.4.1. MMP-9

Die Konzentration von MMP-9 stieg nichtsignifikant um 32 % (81 ng/ml) von 252,6 ng/ml±152,7 auf 333,6 ng/ml±213,7 (p=0,084).

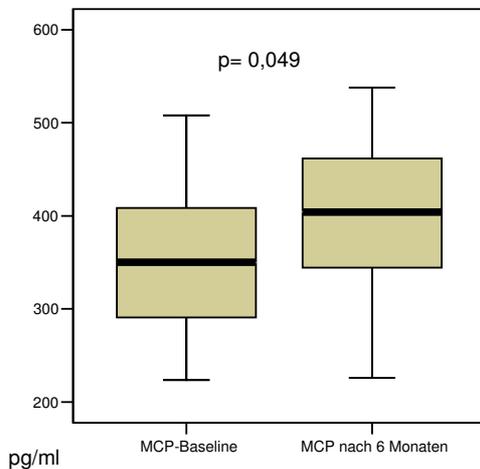


**Abb.13: Baseline - Konzentration der Matrix Metalloproteinase- 9 (MMP-9) und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine nicht-signifikante Zunahme ( $p < 0,084$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

### 3.4.2. MCP-1

Die Konzentration von MCP-1 stieg signifikant um 15,5 % (65,2 pg/ml) von 418,5 pg/ml $\pm$ 284,7 auf 483,7 pg/ml $\pm$ 378,0 ( $p=0,049$ ).



**Abb.14: Baseline - Konzentration des Monocyte-chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile, den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

### 3.4.3. ICAM-1

Die Konzentration von ICAM-1 blieb während des Studienzeitraumes unverändert (311,0 ng/ml $\pm$ 151,0 vs. 310,6 ng/ml $\pm$ 158,0,  $p=0,831$ ).

### 3.4.4. VCAM-1

Die Konzentration von VCAM-1 stieg nichtsignifikant leicht um 4,3 % (34,6 ng/ml) von 800,2 ng/ml $\pm$ 216,7 auf 834,8 ng/ml $\pm$ 293,4 ( $p= 0,492$ ).

### 3.4.5. E-Selectin

Die Konzentration von E-Selectin zeigte keine signifikanten Veränderungen im untersuchten Studienzeitraum (66,3 ng/ml $\pm$ 37,6 vs. 65,5 ng/ml $\pm$ 36,7,  $p= 0,435$ ).

### 3.5. Gerinnungsparameter

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte der untersuchten Gerinnungsparameter vor Beginn der Studie und sechs Monate nach Umstellung auf eine Insulintherapie.

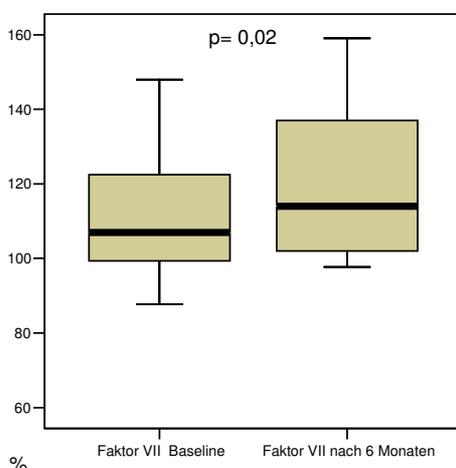
	Baseline	6 Monate unter Insulintherapie	p ( 0 + 6 Mon.)
Fibrinogen (mg/dl)	313,7 (195,0-400,0)	313,1 (179,0-459,0)	0,850
Faktor VII (%)	105 (14,6-148,0)	114 (24,8-159,0)	<b>0,020</b>
Faktor VIII (%)	95,0 (50,4-147,5)	105 (57,3-157,0)	0,118
D-Dimer (mg/ml)	205 (86,9-1024,5)	223 (63,8-1132,0)	0,309
PAI-1 Aktivität (ng/ml)	2,11 (0,26-7,5)	2,12 (0,15-7,6)	0,501
PAI-1 Ag (ng/ml)	22,0 (6,0-49,0)	23,1 (5,0-50,0)	0,794

#### 3.5.1. Fibrinogen

Im untersuchten Studienzeitraum zeigte sich die Konzentration von Fibrinogen unverändert ( $313,7 \text{ mg/dl} \pm 53,1$  vs.  $313,1 \pm 313,1 \text{ mg/dl} \pm 60,9$ ,  $p = 0,850$ ).

#### 3.5.2. Faktor VII

Die Aktivität von Faktor VII erhöhte sich signifikant ( $p = 0,02$ ) von  $105 \% \pm 29,3$  auf  $114,7 \% \pm 31,1$ . Dies entspricht einer prozentualen Veränderung von  $9,2 \%$ .



**Abb.15: Baseline - Aktivität von Faktor VII und Veränderung nach 6 Monaten Insulintherapie.**

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme ( $p < 0,02$ ). Der Boxplot zeigt die 25. Perzentile,

den Median und die 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum als horizontale Linie ausserhalb der Box.

### **3.5.3. Faktor VIII**

Die Aktivität von Faktor VIII stieg nichtsignifikant um 9,6 % (9,2%) von 95,8 % $\pm$ 28,8 auf 105 % $\pm$ 29,5 (p= 0,118).

### **3.5.4. D-Dimer**

Die Konzentration des D-Dimers erhöhte sich statistisch nicht signifikant um 8,8 % (18,1 ng/ml) von 205,1 mg/ml $\pm$ 228,5 auf 223,2 ng/ml $\pm$ 247,7; p= 0,309).

### **3.5.5. PAI-1**

Die PAI-1 Aktivität (2,11 ng/ml $\pm$ 2,13 vs. 2,12 ng/ml  $\pm$ 2,2 ; p= 0,501) zeigte ebenso wie die PAI-1 -Ag Konzentration (22,0 ng/ml $\pm$ 14,6 vs. 23,1 ng/ml $\pm$ 15,8 ; p=0,794) keine relevante Änderung.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Sind inflammatorische Biomarker bei Patienten mit Typ-2-Diabetes erhöht?**

Die Atherosklerose ist ein lokaler, unspezifischer inflammatorischer Prozess, der von einer systemischen Antwort begleitet wird (Lind 2002).

Eine Vielzahl von Untersuchungen deuten auf eine enge Verbindung von Typ-2-Diabetes mit subklinischen systemischen Entzündungsvorgängen hin (Pickup 2004).

Bei Patienten mit Diabetes als auch bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen konnten klinische Untersuchungen erhöhte Spiegel einer Vielzahl von inflammatorischen Biomarkern im Plasma nachweisen. Prospektive Studien der letzten Jahre zeigten dazu, dass erhöhte Konzentrationen verschiedener inflammatorischer Parameter prädiktiv für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes sind. Im Einklang mit vielen Untersuchungen der letzten Jahre fanden sich auch bei unseren Patienten vor Beginn der Therapieumstellung erhöhte Spiegel bei einer Mehrheit der untersuchten Inflammationsmarker. Sämtliche in unserer Studie untersuchten Marker einer endothelialen Dysfunktion (MMP-9, MCP-1, E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1) als auch hs-CRP, PAI-1 sowie Homocystein zeigten sich erhöht im Vergleich mit gesunden Probanden.

Damit verbundene endotheliale Entzündungsvorgänge und deren systemische Messbarkeit und Nachweisbarkeit im Serum belegen deutlich das vorhandene kardiovaskuläre Risiko von Patienten mit Diabetes. Unsere Studie unterstreicht somit die auch von anderen Autoren beschriebenen Funde. Typ-2-Diabetiker mit ungenügender Stoffwechselkontrolle zeigen Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion und einer niedriggradigen systemisch messbaren Entzündung.

Das C-reaktive Protein gilt als der bisher am besten untersuchter Biomarker (Ridker 2004) und ist in prospektiven Studien zum Typ-2-Diabetes am häufigsten untersucht worden, wenn auch mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. So berichtet eine Vielzahl von Studien über eine Assoziation von erhöhten CRP-Spiegeln mit dem zukünftigen Risiko eines Typ-2-Diabetes nach Adjustierung für den Body-mass-Index (Pradhan 2001, Barzilay 2001, Freeman 2002, Spranger 2003, Nakanishi 2003, Hu

2004), während andere Studien nach Abgleich mit dem BMI keine Assoziation mehr fanden (Festa 2002, Thorand 2003). Die Konzentrationen des hs-CRP zeigen sich im Serum von Patienten mit Typ-2-Diabetes erhöht (Avilés-Santa 2006).

Im Gegensatz zu den anderen Entzündungsparametern bietet die Bestimmung des hs-CRP aber auch zusätzliche prognostische Information zum kardiovaskulären Risiko in Addition zum Framingham Risk Score (FRS) und zu den Konzentrationen des LDL (Ridker 2004). Im Jahr 2003 wurden von der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und der American Heart Association (AHA) erstmalig klinische Leitlinien zur Risikoabschätzung mittels hs-CRP veröffentlicht. Danach bedeutet eine Konzentration von  $<1,0$  mg/l ein niedriges Risiko, zwischen 1 bis 3 mg/l ein mittleres Risiko und  $>3,0$  mg/l ein hohes Risiko.

Mit einer mittleren hs-CRP Konzentration von 3,6 mg/l bzw. von 4,2 mg/l nach sechsmonatiger Insulintherapie fallen die Patienten unserer Studie danach in die Risikoklasse mit hohem vaskulären Risiko.

IL-6 wurde von einigen Autoren als Insulinresistenz-auslösender Faktor klassifiziert, da erhöhte IL-6 Plasmaspiegel bei Übergewicht, Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes auftreten (Pickup 1997, Vozarova 2001). In verschiedenen Studien zeigte sich die Höhe der IL-6 Plasmakonzentrationen mit der Entstehung von Insulinresistenz und der Entwicklung eines manifesten Typ-2-Diabetes assoziiert (Fernandez-Real 2001, Pradhan 2001).

Eine prospektive 5-Jahres-Studie über die kombinierte Auswirkung von Hyperhomocysteinämie und Diabetes mellitus Typ 2 auf die Mortalität von 2484 Männern und Frauen hat gezeigt, dass die Hyperhomocysteinämie unabhängig von anderen Risikofaktoren mit der Mortalität in Beziehung steht und bei Patienten mit Typ-2-Diabetes ein stärkerer Mortalitätsfaktor ist (1,9 mal höher) als in Patienten ohne Diabetes (Hoogeveen 2000).

Erhöhte Konzentrationen von Lp(a) im Serum von Patienten mit Typ-2-Diabetes sind assoziiert mit einem hohen Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen (Shai 2004, Hiraga 1995). Inwieweit Lp(a) bei Typ-2-Diabetikern erhöht ist und ob sich eine Senkung durch eine Verbesserung der Blutglukoseeinstellung erreichen lässt, ist nicht eindeutig. Eine Studie verglich die Serum Lp(a) - Konzentrationen von gesunden Probanden mit zwei unterschiedlichen Gruppen von Typ-2-Diabetikern ( $HbA_{1c} < 8,0\%$  bzw.  $HbA_{1c} \geq 8,0\%$  und höher). Hierbei fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Serumspiegeln (Chang 1995). Eine weitere Studie untersuchte,

ob sich die Serumspiegel von Lp(a) in unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Diät – orale Antidiabetika – Insulintherapie) unterscheiden. Heller et al. (1993) fanden hierbei hohe Lp(a)-Spiegel im Serum von Patienten mit Insulintherapie und vermuteten als Ursache die chronische Hyperinsulinämie jener Gruppe.

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 haben auch erhöhte Plasma-Konzentrationen der löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin (Moussavi 2004, Cominacini 1995, Steiner 1996, Fasching 1996). Während ICAM-1 ein früher Marker der Vaskulopathie und ein Prädiktor der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei Typ-2-Diabetikern zu sein scheint (Lim 1999, Jude 2002, Becker 2002), ist VCAM-1 ein Indikator für die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen und ist zusätzlich assoziiert mit der kardiovaskulären Mortalität (Otsuki 1997, Peter 1997, Jager 2000).

In einer großen prospektiven Kohortenstudie zeigten sich erhöhte Konzentrationen von E-Selectin und ICAM-1 als Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes Typ 2. Besonders Männer mit E-Selectin –Spiegel im höchsten Tertil hatten ein 2,6 fach höheres Risiko als jene Probanden im niedrigsten Tertil (Thorand 2006).

Obwohl noch wenig untersucht, weisen Untersuchungen auch auf erhöhte MCP-1 Konzentrationen im Serum von Patienten mit Typ-2-Diabetes hin (Simeoni 2004).

In der Monica / Kora Augsburg Studie zeigte sich MCP-1 als Prädiktor für einen sich später entwickelnden Diabetes mellitus unabhängig von den anderen klassischen Risikofaktoren (Herder 2006).

Eine Reihe klinischer Studien fand eine Assoziation der MMP-9- Konzentration im Serum mit vorzeitiger Koronarsklerose (Noji 2001), als auch mit instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkten (Inokubo 2001).

Zu der Höhe der MMP-9 Spiegel im Plasma von Patienten mit Typ-2-Diabetes jedoch gibt es nur sehr vereinzelte Untersuchungen. Lee et al. (2004) fanden bei 80 Patienten mit Typ-2-Diabetes keine erhöhten Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden. Death et al. konnten wiederum zeigen, dass Hyperglykämie die Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP) in Endothelzellen und Makrophagen erhöht (Death 2003).

Auch für Faktoren des hämeostaseologischen Systems gibt es Hinweise auf deren Erhöhung bei Vorliegen eines Diabetes.

Noch wenig untersucht, aber auch Fibrinogen scheint bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöht (Ganda 1992).

Carmassi et al. (1992) konnten bei Typ-2-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung erhöhte Konzentrationen von Faktor VII nachweisen.

Faktor VIII ist erhöht in Entzündungsprozessen (Mathonnet 1996) und assoziiert mit neu auftretendem Typ-2-Diabetes (Duncan 1999). Außerdem konnte in der Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Studie gezeigt werden, dass Faktor VIII Prädiktor einer kardiovaskulären Erkrankung bei Patienten mit Typ-2-Diabetes ist (Saito 2000). Seine Konzentration bei Patienten mit Typ-2-Diabetes scheint erhöht (Adelstein 1979, Garcia 1987, Hughes 1983).

Im Plasma von Patienten mit Typ-2-Diabetes wurden höhere PAI-1-Aktivitäten gemessen als bei vergleichbaren Nichtdiabetikern (Juhan-Vague 1991).

In der IRAS-Studie (Insulin Resistance Atherosclerosis Study) war PAI-1 ein signifikanter Prädiktor für einen sich später entwickelnden Diabetes. Diese Assoziation war auch noch signifikant, wenn multivariat für die üblichen Risikofaktoren sowie für Nüchterninsulin, BMI und Bauchumfang ausgeglichen wurde (Festa 2002 und 2006).

Zur Höhe der D-Dimer-Spiegel bei Patienten mit Typ-2-Diabetes wurden bisher nur wenige prospektive Studien durchgeführt. So fanden Reverter et al. (1997), Aso et al. (2002) und Coban et al. (2005) erhöhte D-Dimer –Konzentrationen, während Garcia et al. (1987) sogar verminderte Spiegel feststellten.

#### **4.2. Der Einfluss einer Insulintherapie auf Inflammationsmarker der Atherosklerose**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Inflammations- und endotheliale Marker der Atherosklerose sowie Gerinnungsfaktoren bzw. Marker der Fibrinolyse vor und sechs Monate nach Beginn einer Insulintherapie bei 17 Patienten mit Typ-2-Diabetes im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie gemessen.

Wie zu erwarten, konnten wir eine signifikante Verbesserung des Glukose-Stoffwechsels, sichtbar an einer verbesserten Nüchtern-Blutglukose und an einem

Absinken des HbA1C, erreichen. Obwohl in unserer Studie eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechseleinstellung in einem Zeitraum von 6 Monaten erreicht wurde, konnte von uns kein anti-inflammatorischer Effekt des Insulins auf die untersuchten inflammatorischen Biomarker gefunden werden. Vielmehr fanden wir eine signifikante Zunahme des Chemokins MCP-1 um 15,5 %, der Aktivität des Gerinnungsfaktors VII um 9,2 % und einen tendenziellen, jedoch nicht statistisch-signifikanten Anstieg weiterer Marker wie hs-CRP, MMP-9, VCAM-1, Faktor VIII und D-Dimer nach sechsmonatiger Insulintherapie. Insulin hatte in unserer Studie keinen statistisch messbaren Einfluss auf das hs-CRP. Tendenziell beobachteten wir sogar einen Anstieg des C-reaktiven Proteins um 14,3 % auf 4,2 mg/l durch die Insulinapplikation.

Experimentelle und klinische Untersuchungen belegen, dass Inflammationsmarker nicht nur allein Marker einer Inflammation sind, sondern vielmehr auch auf allen Ebenen der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen.

Die systemische Messbarkeit der Biomarker sowie standardisierte und reproduzierbare laborchemische Testverfahren mit einfacher Durchführbarkeit haben Interventionsstudien zum Einfluss von antidiabetischer Medikation auf jene Inflammationsmarker möglich gemacht.

Der Einfluss einer Insulintherapie wurde bisher nur in wenigen prospektiven klinischen Studien untersucht.

Große prospektive Plazebo-kontrollierte Studien zum Effekt einer Insulintherapie auf Marker der Atherosklerose fehlen bislang. Jedoch gibt es eine Reihe kleinerer Studien mit jedoch zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Vergleichbarkeit wird erschwert, da die existierenden Studien unterschiedliche Biomarker in unterschiedlichem Studiendesign untersuchen.

#### **4.2.1. hs-CRP**

Einen signifikanten antiinflammatorischen Effekt des Insulins auf das hs-CRP fanden Yudkin et al. (2000). In einer vom Umfang mit unserer Arbeit vergleichbaren prospektiven Studie bei 22 Patienten mit Typ-2-Diabetes fanden die Autoren ein signifikantes Absinken des hs-CRPs nach sechzehnwöchiger Insulintherapie. Alle weiteren untersuchten Parameter hingegen, wie unter anderem E-Selectin, ICAM-1, Fibrinogen und IL-6, zeigten keine Änderungen. Interessanterweise hatte eine

Vergleichsgruppe in derselben Crossover-Studie durch eine Sulphonylharnstoff-Therapie trotz signifikanter Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage keinerlei messbaren Effekt auf die untersuchten Marker inklusive des hs-CRP. Ein durch Sulphonylharnstoff-Therapie zwar genauso wie durch Insulingabe auf 8,6% abgesunkener HbA<sub>1c</sub>, jedoch ein weniger stark erreichter Anstieg des endogenen Insulins haben scheinbar kein Absinken der Konzentration des hs-CRP zur Folge. Das, so die Autoren, spräche für einen antiinflammatorischen Effekt des Insulins auf hepatische Akute-Phase-Proteine und verweisen hierbei auf Untersuchungen bei hepatischen Zellen von Ratten. Hier zeigte sich Insulin als starker Inhibitor einer Cytokin-induzierten Transkription von Akute-Phase-Proteinen (Campos 1992).

In einer prospektiven Studie von Takebayashi et al. (2004) bei 18 ungenügend eingestellten japanischen Patienten mit einem HbA<sub>1c</sub> von 11,0% bei Studienbeginn, zeigte sich innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen eine geringe, aber signifikante Reduktion des hs-CRP. Fibrinogen und MCP-1 blieben unverändert. Eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien erschweren folgende zwei Punkte: Der Therapieerfolg konnte wegen der kurzen Dauer nur an einer signifikanten Reduktion der Nüchtern-Blutglukose bemessen werden und der mittlere BMI von 24,4 kg/m<sup>2</sup>, mit einer für übergewichtige asiatische Patienten typischen Größe, ist in westlichen Studienpopulationen deutlich höher.

Avilés-Santa et al. (2006) untersuchten in vergleichbarem Studiendesign im Rahmen einer prospektiven Studie den Langzeiteinfluss einer Insulintherapie auf eine Vielzahl von Inflammationsmarkern (hs-CRP, Homocystein, PAI-1, Fibrinogen, vWF, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin, MCP-1, Adiponectin) bei Patienten lateinamerikanischer Herkunft, in den USA lebend. Rekrutiert werden konnten 57 Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2, die vorher entweder schon mit Insulin oder mit OAD in Monotherapie oder Kombinationstherapie behandelt wurden. Sowohl nach 52 Wochen mit 23 Patienten als auch nach 104 Wochen mit noch 18 Patienten konnte trotz signifikanter Verbesserung des HbA<sub>1c</sub> von 10,3% auf 8,0% bzw. 9,8% auf 7,5% keine Verbesserung der Konzentrationen der Inflammationsmarker festgestellt werden. Vielmehr, so die Vermutung der Autoren, sei es trotz signifikanter Zunahme des BMI durch die Insulintherapie, nicht zu einer Verschlechterung gekommen. Ähnlich wie in unserer Studie zeigten sich auch hier vor Beginn der Umstellung erhöhte Konzentrationen von MCP-1 sowie des hs-CRP und gleichzeitig konnte nach 52 Wochen ein tendenzielles Ansteigen des hs-CRP beobachtet werden.

Insulin hatte in unserer Studie keinen statistisch messbaren Einfluss auf das hs-CRP. Tendenziell beobachteten wir sogar im Gegensatz zu Yudkin et al. (2000), dessen Arbeitsgruppe einen antiinflammatorischen Effekt des Insulins auf das CRP fanden, einen Anstieg des C-reaktiven Proteins um 14,3 % auf 4,2 mg/l durch die Insulingabe und gleichzeitig ein statistisch signifikantes Ansteigen des Chemokins MCP-1.

Dieses gilt als wichtigstes Chemokin der Atherogenese.

Basierend auf Daten aus Versuchen mit knockout Mäusen geht man davon aus, dass die primäre biologische Funktion von MCP-1 in der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten in inflammatorischen Arealen liegt. Das Chemokin ist in der Lage Chemotaxis, Aktivierung und Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen unter Flussbedingungen zu triggern und damit die Extravasation von Monozyten zu fördern. Obwohl es mehrere Phänotypen von MCP gibt, zeigt MCP-1 die stärkste chemotaktische Wirkung und die stärksten proangiogenen Eigenschaften (Butcher 1996, Horuk 1994 und 1996, Baggiolini 1997).

Das C-reaktive Protein wiederum fördert über eine Hochregulierung des CC Chemokin 2 Rezeptors die Bildung von MCP-1 (Han 2004, Venugopal 2005).

Unsere Beobachtung, dass sowohl MCP-1 (signifikant) als auch das hs-CRP (tendenziell) nach sechs Monaten angestiegen sind, liese sich vor diesem Hintergrund erklären.

#### **4.2.2. Lp(a)**

In der prospektiven Veterans Affairs Cooperative Study in Type 2 Diabetes Mellitus fand sich nach intensivierter Insulintherapie mit verbesserter Stoffwechseleinstellung keine Änderung in den Lp(a) Konzentrationen (Emanuele 1998). Dagegen konnte in einer anderen prospektiven Studie durch eine verbesserte Blutglukoseeinstellung, entweder durch eine Insulintherapie oder durch Sulphonylharnstofftherapie, eine Senkung der Lp(a) Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Patienten erreicht werden (Alagozlu 2000).

### **4.2.3. Endotheliale Marker (E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, MMP-9)**

Eine signifikante Reduktion von E-Selectin fand eine prospektive Studie von Ryysy et al. (2001). Lösliche Adhäsionsmoleküle (E-Selectin und VCAM-1) wurden bei 81 Patienten mit Typ-2-Diabetes, 3 und 12 Monate nach Beginn einer Kombinationstherapie von NPH-Insulin mit entweder Glibenclamid (n=19), Metformin (n=17), Glibenclamid und Metformin (n=17) oder morgendlicher Gabe von NPH-Insulin (n=23) untersucht. Hierbei fanden die Autoren unabhängig von der Art der antidiabetischen Therapie drei Monate nach Studienbeginn und nach Erreichen einer signifikant verbesserten diabetischen Stoffwechsellage, sichtbar an einer Reduktion des HbA<sub>1c</sub>, ein Absinken der E-Selectin Spiegel.

Eine weitere prospektive Studie untersuchte, ebenso über zwei Wochen, den Einfluss einer Insulintherapie bei 16 Patienten mit Typ-2-Diabetes auf die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin. Albertini et al. (1998) fanden hierbei eine signifikante Reduktion von E-Selectin. Die Patienten, mit einem HbA<sub>1c</sub> von 9,5% unter maximaler oraler antidiabetischer Medikation und ebenso wie die Patienten unserer Studie mit einem hohen Anteil diabetischer Folgeerkrankungen, wurden im Fall dieser Studie allerdings im Unterschied zu anderen Studien während eines stationären Aufenthaltes mittels Insulinpumpentherapie behandelt.

Einen unmittelbaren suppressiven Effekt von Insulin auf MMP-9 und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mittels Insulininfusion (2 IU/h über 4 Stunden) bei zehn adipösen, nicht-diabetischen gesunden Probanden, fanden Dandona et al. (2003). Eine Dextrose-Infusion erhöhte dagegen die Konzentration von MMP-9, während Kochsalz-Gabe keinerlei Effekt auf die Marker hatte.

Die oben erwähnte Studie von Avilés-Santa et al. (2006) untersuchte auch den Einfluss einer Insulintherapie auf endotheliale Marker (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin, MCP-1). Trotz signifikanter Verbesserung des HbA<sub>1c</sub> fand sich keine Verbesserung der Konzentrationen dieser Inflammationsmarker.

Die Wirkung einer verbesserten Stoffwechseleinstellung auf endotheliale Marker unabhängig von der dazu benötigten antidiabetischen Therapie wurde von Bagg et al. (2001) in einem anderen Studiendesign mit einer Studiendauer von 20 Wochen und insgesamt 41 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht. Ziel war Erreichen einer euglykämischen Stoffwechsellage in einer Gruppe von Patienten mit intensivierter Stoffwechselkontrolle unter anfänglicher oraler Medikation und

schrittweiser Eskalation bis zu einer Insulingabe bei Nichterreichen vorgegebener Werte bei den Selbstmessungen. Die damit erreichte verbesserte Stoffwechsellage zeigte sich in einem signifikant verbessertem HbA<sub>1c</sub> von 8,2% (Baseline: 10,8%) und wurde verglichen mit einer Gruppe von Typ-2-Diabetikern mit nur einfacher Stoffwechselkontrolle (Vermeidung von symptomatischer Hyperglykämie), deren mittlerer HbA<sub>1c</sub> im Verlauf der Studie unverändert blieb (10,47% vs. 10,23%). Auch hier zeigten sich zu Beginn im Vergleich mit einer Kontrollgruppe bestehend aus 21 gesunden Probanden erhöhte Spiegel endothelialer Marker. Nach 20 Wochen - in der Gruppe der intensivierten Stoffwechseleinstellung erhielten 94% aller Patienten nun Insulin allein oder in Kombination mit OAD - zeigten sich in beiden Gruppen keine Änderungen in den Konzentrationen von E-Selectin, ICAM-1, VCAM-1 und PAI-1. Patienten mit einem BMI von 28 kg/m<sup>2</sup> oder weniger hatten Konzentrationen von E-Selectin und ICAM-1 vergleichbar mit den gesunden Probanden.

#### **4.3. Der Einfluss einer Insulintherapie auf Gerinnungsfaktoren und Marker der Fibrinolyse**

Während die Zahl an Studien, die Veränderungen in der Haemostaseologie, sei es quantitativ oder qualitativ, beim Diabetes zeigen, hoch ist, gibt es nur wenige Interventionsstudien. Hughes et al. (1983) fanden im Gegensatz zu unserem Ergebnis - mit keiner feststellbaren Änderung - durch eine Insulintherapie eine Abnahme schon zu Beginn erhöhter Faktor VIII Aktivität.

Den Einfluss einer Insulintherapie auf Faktor VII und andere haemostaseologische Faktoren untersuchten zwei prospektive Studien. Keinen Effekt durch Insulin und eine verbesserte diabetische Stoffwechseleinstellung bei 61 Patienten mit Typ-2 Diabetes fanden Knobl et al. (1994). Weder Fibrinogen, D-Dimer oder Faktor VII, allesamt erhöht verglichen mit einer Kontrollgruppe gesunder Probanden, zeigten nach 6 Monaten eine Änderung ihrer Konzentration.

Dagegen konnten wiederum in einer anderen prospektiven Studie 17 Patienten – in diesem Fall jedoch mit Typ-1-Diabetes und Proteinurie – von einer 12 monatigen intensivierten Insulintherapie mit begleitender signifikanter Verbesserung des HbA<sub>1c</sub>

profitieren. Faktor VII und Fibrinogen – ebenfalls im Sinne einer Hyperkoagulabilität vor Beginn der Studie erhöht – zeigten eine signifikante Reduktion (D'Elia 2001).

In unserer Studie wiederum fand sich nach 24 Wochen eine statistisch signifikante Zunahme der Faktor VII Aktivität um 9,2%.

PAI-1, für den unter den Faktoren des fibrinolytischen Systems der engste Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen besteht (Nordt 1999) zeigte sich erhöht vor Studienbeginn, wurde aber durch die Insulintherapie nicht beeinflusst.

Ebenso fanden Vukovich et al. (1992) in einer prospektiven Studie bei 19 Patienten keinen Effekt einer Insulintherapie auf PAI-1 nach 16 Wochen Insulintherapie.

Auch in der oben beschriebenen Studie von Bagg et al. (2001) zeigte sich trotz signifikant verbesserter Diabetes Einstellung im Vergleich zu der Behandlungsgruppe mit einfacher Stoffwechselkontrolle keinerlei Änderungen in den Konzentrationen von PAI-1.

Wiederum ein anderes Ergebnis liefern Jain und Kollegen (1993). In deren prospektiver Studie fand sich eine Suppression der PAI-1-Aktivität durch eine Therapie mit Insulin bei einer kleinen Studienpopulation von 11 Patienten mit Typ-2 Diabetes. Dies in einem kurzem Zeitraum von 8 Wochen und bemerkenswerterweise sogar unabhängig von einer Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage.

Faktor VII wird in der Leber synthetisiert. Sehr wenig ist bisher bekannt über eine Synthese ausserhalb der Leber. Wilcox et al. konnten mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen, in-situ Hybridisation und reverser Transcriptase – Polymerase Kettenreaktion (TR-PCR) zeigen, dass Faktor VII in atherosklerotisch veränderten und in geringem Maße auch in normalen Gefäßabschnitten nachweisbar ist. Vor allem aber fanden die Autoren, dass Faktor VII an Stellen atherosklerotischer Läsionen von Makrophagen und glatten Muskelzellen (SMC) synthetisiert wird (Wilcox 2003). Dies, so die Autoren weiter, erhöhe möglicherweise das thrombogene Potential in den artherosklerotischen Plaques und deute auf ein unmittelbares Mitwirken von Faktor VII an der Atherogenese hin.

In unserer Studie stellten wir einen signifikanten Anstieg der Faktor VII Aktivität um 9,2 % von 105% auf 114,7% nach sechsmonatiger Insulintherapie fest.

#### **4.4. Limitationen des Studiendesigns**

Mit einer Anzahl von 17 Patienten und nicht Plazebo-kontrolliert kann unsere Studie nur als erster Schritt und als Pilotstudie angesehen werden.

Unsere Patienten - mit einem hohen Anteil an diabetischen Folgeerkrankungen - wurden interindividuell beobachtet und es fehlte eine Kontrollgruppe.

Eventuell wären weitere statistisch relevante Effekte bei einer höheren Probandenzahl zu sehen gewesen. Andere Studien, die den Einfluss einer Insulintherapie auf Inflammationsmarker untersuchen wollten, umfassen jedoch zum Großteil eine ähnliche Patientenzahl mit teilweise weniger oder nur ungleich mehr Patienten.

Die Beobachtungszeit von sechs Monaten ist für eine offene, unkontrollierte Pilotstudie sicherlich ausreichend. Andere bisher vorliegende Studien untersuchten teilweise nur Kurzzeiteffekte des Insulins mit einer Beobachtungszeit von zwei Wochen, während andere den Effekt über 12 Monate beobachteten. Groß angelegte prospektive Interventionsstudien sollten jedoch einen noch längeren Beobachtungszeitraum umfassen, um auch mögliche Langzeiteffekte der Insulingabe zu erfassen.

#### **4.5. Diskussion der Ergebnisse**

Insgesamt lässt sich gegenwärtig nach Betrachtung der vorhandenen Studien kein endgültiges oder schlüssiges Urteil über den Effekt einer Insulintherapie auf inflammatorische Biomarker geben. Während mehrere Studien eine Reduktion inflammatorischer Biomarker sahen, fanden andere Studiengruppen zumindest einen neutralen Effekt. Erschwerend ist, dass sich die Ergebnisse innerhalb einzelner Studien nicht zu einem Bild ergänzen. Unsere Studie - mit einem signifikantem Anstieg zweier Biomarker (MCP-1, Faktor VII) und keiner signifikanten Änderung bei den übrigen Parametern – fügt sich in dieses Bild.

Zusammen mit dem signifikanten Anstieg von MCP-1 und dem tendenziellen Anstieg weiterer Inflammationsmarker (hs-CRP, MMP-9, VCAM-1, D-Dimer) findet sich in unserer Arbeit kein antiinflammatorischer Effekt des Insulins auf die von uns untersuchten Marker. Vielmehr sprechen die von uns im Plasma gemessenen

höheren Konzentrationen bzw. Aktivitäten für ein mögliches Fortschreiten atherosklerotischer Vorgänge.

Unsere Patienten hatten einen hohen Anteil an diabetischen Folgeerkrankungen und eine Diabetesdauer von im Durchschnitt 11 Jahren.

Im Studienzeitraum von sechs Monaten wurde, wie zu erwarten, eine signifikante Verbesserung des Glukose-Stoffwechsels, sichtbar an einer verbesserten Nüchtern-Blutglukose und an einem Absinken des HbA<sub>1c</sub>, erreicht.

Ein deutlich vorhandener antiinflammatorischer Effekt des Insulins müsste, aus unserer Sicht, gerade an einem solchen Patientengut, welches typisch ist für eine notwendig gewordene Insulinumstellung, nachweisbar werden.

Kritisch bemerkt werden muss jedoch auch, dass wir zwar eine signifikante Verbesserung der Stoffwechseleinstellung erreichten, jedoch die von den Fachgesellschaften empfohlenen Zielwerte innerhalb von 24 Wochen nicht erreichten.

Hat vielleicht erst eine weitere Verbesserung des HbA<sub>1c</sub> auf den in den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft geforderten Zielwert von 6,5% und eine noch bessere Senkung der Nüchtern -Blutglucose sowie vor allem der postprandialen Werte einen antiinflammatorischen Effekt auf die Konzentrationen der Marker ?

In einer Untersuchung von Festa et al. (2002) zeigten sich erhöhte CRP-Spiegel stärker assoziiert mit postprandialer Hyperglykämie als mit erhöhter Nüchtern-Blutglukose.

Eine andere Möglichkeit des fehlenden antiinflammatorischen Effektes könnte eine zu kurze Beobachtungszeit sein. Angesichts einer mittleren Diabetesdauer von 11 Jahren in unserem Patientengut mit teilweise ungenügender diabetischer Stoffwechseleinstellung - verbunden mit Dyslipidämie, arterieller Hypertonie, Nikotinkonsum und Übergewicht - sind durch die an den Endothelien abgelaufenen Entzündungsprozesse möglicherweise irreversible bzw. nur langfristig beeinflussbare atherosklerotische Veränderungen initiiert worden. Schon erwähnte beobachtete antiinflammatorische Effekte des Insulins wie Inhibition von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie Egr-1 oder NF-κB und damit Hemmung korrespondierender Gene, die Inflammation vermitteln, könnten möglicherweise in vivo nur von einer längeren erfolgreichen Insulintherapie beeinflussbar sein.

Die Patienten in der Studie von Yudkin et al. hatten beispielsweise nur eine durchschnittliche Diabetesdauer von vier Jahren.

Um dieser Frage nachzugehen fehlen jedoch bislang große über einen langen Zeitraum angelegte Plazebo-kontrollierte Interventionsstudien.

Von großer Bedeutung müsste hierbei auch auf die zeitliche Beziehung der Veränderungen in den Konzentrationen der zirkulierenden Biomarker im Verlauf der Entwicklung einer gestörten Glukose-Toleranz hin zum manifesten Typ-2-Diabetes gelegt werden. In der Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) konnte zum Beispiel ein Anstieg der PAI-1 Spiegel bei prädiabetischen Individuen mit über die Zeit steigenden Glucose-Konzentrationen im Serum und mit der Entwicklung eines manifesten Diabetes beobachtet werden (Festa 2006).

Eine lang angelegte prospektive Studie mit Kindern oder jungen Erwachsenen, von denen ein immer größerer Prozentsatz einen Typ-2-Diabetes in Verbindung mit Übergewicht entwickeln, könnte hierzu ein interessanter Ansatz sein.

In unserer Studie konnten wir keine signifikante Gewichtszunahme feststellen, jedoch waren die Patienten wie in den meisten anderen vergleichbaren Studien mit einem BMI von 28,8 bzw. 29,0 kg/m<sup>2</sup> deutlich übergewichtig.

## 5. Zusammenfassung

Die Pathogenese der Atherosklerose ist ein hochkomplexer, aktiver Prozess, in dessen Entwicklung die Inflammation eine zentrale Rolle spielt.

Patienten mit Typ-2-Diabetes haben ein hohes vaskuläres Risiko. Die Assoziation von Hyperinsulinämie und KHK, sowie ein Anstieg von Wachstumsfaktoren durch Insulin in vivo führten zu der Annahme Insulin sei potentiell atherogen und proinflammatorisch.

Eine Reihe neuerer Funde haben dagegen einen antiinflammatorischen und antiatherogenen Effekt von Insulin neben seinen bekannten metabolischen Wirkungen, zeigen können.

Ein Teil der Patienten entwickeln ohne bestehende Risikofaktoren wie Dyslipidämie eine koronare Herzerkrankung. Dies macht die Suche nach neuen Risikomarkern notwendig, um Hochrisikopatienten frühzeitig zu erkennen und einer manifesten Atherosklerose mit all ihren Komplikationen vorzubeugen.

Sogenannte Surrogatparameter - Parameter, die mit der Entstehung einer Atherosklerose assoziiert sind - spielen auf allen Ebenen der Atherogenese eine Rolle und sind, da im Blut löslich, auch messbar.

Eine Vielzahl prospektiver Studien konnte einen deutlichen Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern wie Zytokinen (IL-6), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin), Chemokinen wie MCP-1 (monocyte-chemoattractant-protein-1), verschiedenen klassischen Inflammationsparametern (hs-CRP, Homocystein, Lp(a), Fibrinogen), Faktoren des hämostaseologischen Systems (D-Dimer, PAI-1, Faktor VII, Faktor VIII) und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten zeigen.

Zusätzlich wurden in den letzten Jahren in prospektiven Studien erfolgreich zahlreiche inflammatorische Biomarker bezüglich ihrer prädiktiven Aussagekraft für die Entwicklung eines Diabetes untersucht, auch zeigte sich, dass diese bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden im Serum erhöht sind.

Bisher kaum untersucht wurde der Einfluss einer Insulintherapie auf diese im Blut löslichen und messbaren Biomarker über einen längeren Zeitraum.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Insulintherapie auf

Inflammations- und endotheliale Marker der Atherosklerose sowie auf Gerinnungsfaktoren bzw. Marker der Fibrinolyse bei Patienten mit Typ-2-Diabetes untersucht. In dieser prospektiven Pilotstudie wurden 17 Patienten mit ungenügender Stoffwechseleinstellung unter oraler antidiabetischer Therapie auf eine Insulintherapie umgestellt.

Obwohl durch eine Insulintherapie eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechseleinstellung in einem Zeitraum von sechs Monaten erreicht wurde, konnte kein antiinflammatorischer Effekt des Insulins auf die untersuchten inflammatorischen Biomarker gefunden werden. Vielmehr fanden wir eine signifikante Zunahme des endothelalen Markers MCP-1 um 15,5 %, der Aktivität des Gerinnungsfaktors VII um 9,2 % und einen tendenziellen, jedoch nicht statistisch-signifikanten Anstieg weiterer Marker wie hs-CRP, MMP-9, VCAM-1, Faktor VIII und D-Dimer nach sechsmonatiger Insulintherapie.

Alle weiteren untersuchten Biomarker zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen.

Der signifikante Anstieg von MCP-1 als wichtigstes Chemokin der Atherogenese und essentiell für die Leukozytenmigration, der Aktivität von Faktor VII und der tendenzielle Anstieg von hs-CRP, MMP-9, VCAM-1 und des D-Dimers kann auch als fortschreitende Atherosklerose gedeutet werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich bei Patienten mit Typ-2-Diabetes durch eine Insulintherapie über einen Zeitraum von sechs Monaten mit damit verbundener Verbesserung der diabetischen Stoffwechseleinstellung kein antiinflammatorischer Effekt auf Biomarker der Atherosklerose feststellen lässt.

Zur abschliessenden Beurteilung bedarf es jedoch größerer prospektiver Plazebo-kontrollierter Studien.

## 6. Literaturverzeichnis

Abraira C, Colwell J, Nuttall F, Sawin CT, Henderson W, Comstock JP, Emanuele NV, Levin SR, Pacold I, Lee HS. Cardiovascular events and correlates in the Veterans Affairs Diabetes Feasibility Trial. Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type II Diabetes. *Arch Intern Med* (1997) 157(2): 181-8

Acang N, Jalil FD. Hypercoagulation in diabetes mellitus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (1993) 24 Suppl 1: 263-6

Adelstein S, Gomperts ED, Joffe BI, Hockley J. Haemostatic factors in black and white diabetics. *S Afr Med J* (1979) 55: 325-328

Alagozlu H, Gultekin F, Candan F. Lipid and lipoprotein patterns in type 2 non-obese diabetic patients. Do Lp(a) levels decrease with improved glycemic control in these patients? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2000) 10(4): 204-8

Albertini JP, Valensi P, Lormeau B, Aurousseau MH, Ferriere F, Attali JR, Gattegno L. Elevated concentrations of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. Effect of intensive insulin treatment. *Diabetes Care* (1998) 21(6): 1008-13

Alessi MC, Juhan-Vague I, Kooistra T, Declerck PJ, Collen D. Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. *Thromb Haemost* (1988) 60(3): 491-4

Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87: 1419–1422

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* (1974) 20(4): 470-5

Aso Y, Matsumoto S, Fujiwara Y, Tayama K, Inukai T, Takemura Y. Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: association with increased plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism* (2002) 51(4): 471-6

Assmann G, Gotto AM. HDL-cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* (2004) 109 (Suppl III): 8–14

Aviles-Santa L, Salinas K, Adams-Huet B, Raskin P. Insulin therapy, glycemic control, and cardiovascular risk factors in young Latin Americans with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med* (2006) 54(1): 20-31

Bagg W, Ferri C, Desideri G, Gamble G, Ockelford P, Braatvedt GD. The influences of obesity and glycemic control on endothelial activation in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* (2001) 86(11): 5491-7

Bagg W, Whalley GA, Gamble G, Drury PL, Sharpe N, Braatvedt GD. Effects of improved glycaemic control on endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Intern Med J* (2001) 31(6):322-8

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* (1997) 15:675-705

Ballantyne CM, Entman ML. Soluble Adhesion Molecules and the Search for Biomarkers for Atherosclerosis. *Circulation* (2002) 106(7): 766-7

Basta G, Schmidt AM, de Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implication for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Card Vasc Res* (2004) 63: 582–92

Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes* (2001) 50: 2384–2389

Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal- transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* (2002) 105(7): 816-22

Becker A, van Hinsbergh VW, Jager A, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest* (2002) 32(1): 1-8

Begum N, Song Y, Rienzie J, Ragolia L. Vascular smooth muscle cell growth and insulin regulation of mitogen-activated protein kinase in hypertension. *Am J Physiol* (1998) 275: C42-9

Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* (2002) 252: 283–94

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* (2001) 12: 1336-42

Böger RH. Asymmetrisches Dimethylarginin als kardiovaskulärer Risikofaktor. *Dtsch Med Wochenschr* (2004) 129: 820–4

Bork P, Holm L, Sander C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* (1994) 242(4):309-20

Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* (1999) 159:1077-80

- Bowers LD. Kinetic serum creatinine assays I. The role of various factors in determining specificity. *Clin Chem* (1980) 26: 551-554
- Buechler C, Ullrich H, Ritter M, et al. Lipoprotein(a) upregulates the expression of the plasminogen activator inhibitor 2 in human blood monocytes. *Blood* (2001) 97: 981–986
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* (1996) 272(5258): 60-6
- Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23: 1724–31
- Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive production by human coronary artery Smooth muscle cells. *Circulation* (2003) 108: 1930-1932
- Campos SP, Baumann H. Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol* (1992) 4: 1789-97
- Caplice NM, Panetta C, Peterson TE, et al. Lipoprotein (a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood* (2001) 98: 2980–2987
- Carmassi F, Morale M, Puccetti R, De Negri F, Monzani F, Navalesi R, Mariani G. Coagulation and fibrinolytic system impairment in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Res* (1992) 67: 643–654
- Carr ME. Diabetes mellitus. A hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* (2001) 15: 44-54
- Chang CJ, Kao JT, Wu TJ, Lu FH, Tai TY. Serum lipids and lipoprotein(a) concentrations in Chinese NIDDM patients. Relation to metabolic control. *Diabetes Care* (1995) 18(8): 1191-4
- Chaudhuri A, et al. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* (2004) 109: 849-854
- Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, Hennekens CH. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? *Arch Intern Med* (2000) 160: 422–434
- Coban E, Sari R, Ozdogan M, Akcıt F. Levels of plasma fibrinogen and d-dimer in patients with impaired fasting glucose. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2005) 113(1): 35-7
- Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V. Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* (1995) 38(9): 1122-4

Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine. The Über Marker? *Circulation* (2004) 109:1813–9

Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* (2001) 60: 349-356

Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* (2003) 108(12): 1527-32

Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A. Insulin suppresses plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes Care* (2003) 12: 3310-14

Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* (2001) 86: 3257–3265

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* (2005) 111(11): 1448- 54. Review

Dandona P, Aljada A, Mohanty P. The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia* (2002) 45(6):924-30. Review

Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation* (2003) 108(5): 512-5

Danesh J, Collins R, Appleby P, et al. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* (1998) 279: 1477–1482

Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* (2000) 102: 1082–1085

Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* (2005) 294(14): 1799-809

Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Rumley A, Lowe GD. Fibrin D-dimer and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Circulation* (2001) 103: 2323–2327

Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: a potential impact on atherosclerosis in diabetics. *Atherosclerosis* (2003)168: 263-269

De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* (1995) 96: 60–8

Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruithof EK, Juhan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* (1988) 71(1):220-5

D'Elia JA, Weinrauch LA, Gleason RE, Lipinska I, Keough J, Pendse S, Roshan B, Lee AT, Tofler GH. Fibrinogen and factor VII levels improve with glycemic control in patients with type 1 diabetes mellitus who have microvascular complications. *Arch Intern Med* (2001) 161(1): 98-101

De Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thusen JH, Jukema JW, van der Wall EE, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26(2): 340-6

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* (1993) 329(14): 977-86

Du Clos TW. Function of C-reactive -protein. *Ann Med* (2000) 32: 274-278

Duncan BB, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care* (1999) 22(5): 767-72

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* (2005) 365(9468):1415-28. Review

Edgington TS, Curtiss LK, Plow EG. A linkage between the haemostatic and immune systems embodied in the fibrinolytic release of lymphocyte suppressive peptides. *J Immunol* (1985) 134: 471–477

Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2004) 15(7): 521-38

Emanuele N, Azad N, Abaira C, Henderson W, Colwell J et al. Effect of intensive glycemic control on fibrinogen, lipids, and lipoproteins: Veterans Affairs Cooperative Study in Type II Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med* (1998) 158(22): 2485-90

Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: A meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* (1993) 118: 956–963  
Fasching P, Veitl M, Rohac M, Strelj C, Schneider B, Waldhausl W, Wagner OF. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81(12): 4313-17

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin-6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* (2001) 86: 1154-1159

Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* (2002) 51: 1131-1137

Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* (2002) 51(4): 1131-7

Festa A, Williams K, Tracy RP, Wagenknecht LE, Haffner SM. Progression of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in relation to incident type 2 diabetes. *Circulation* (2006) 113(14): 1753-59

Festa A, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) 19(3): 562-8

Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. C-reactive protein is more strongly related to post-glucose load glucose than to fasting glucose in non-diabetic subjects; the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabet Med* (2002) 19(11): 939-43

Folstom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharett AR, Chambles LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities ( ARIC ) Study. *Circulation* (1997) 96: 102-1108

Folstom AR, Aleksic N, Park E, Salomaa V, Juneja H, Wu KK. Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001) 21: 611-617

Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* (1982) 28(10): 2077-80

Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* (2002) 51: 1596-1600

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem* (1972) 18: 449-502

Gabay C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* (1999) 340: 448-54. Review

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* (2002) 90(3): 251-62

Ganda OP, Arkin CF. Hyperfibrinogenemia. An important risk factor for vascular complications in diabetes. *Diabetes Care* (1992) 15(10): 1245-50

Garcia Frade LJ, de la Calle H, Alava I, Navarro JL, et al. Diabetes mellitus as a hypercoagulable state: its relationship with fibrin and fragments and vascular damage. *Thromb Res* (1987) 47: 533-540

Gauldie J, Northemann W, Fey GHO. IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation: hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J Immunol* (1990) 144: 3804–3808

Genuth S. Exogenous insulin administration and cardiovascular risk in non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* (1996)124(1 Pt 2):104-9

Gerbaut L. Immunoturbidimetry of albumin in serum, cerebrospinal fluid, and urine with a unique calibration curve. *Clin Chem* (1987) 33(7):1260-1

Ghanim H, Mohanty P, Aljada A, Chowhan S, Tripathy D, Dandona P. Insulin reduces the pro-inflammatory transcription factor, activation protein-1 (AP-1), in mononuclear cells (MNC) and plasma matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration. *Diabetes* (2001) 50 (suppl 2): A408

Goalstone ML, Natarajan R, Standley PR, Walsh MF, Leitner JW, Carel K, et al. Insulin potentiates platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* (1998) 139(10): 4067-72

Goldstein BJ. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* (2002) 90(5A): 3G-10G. Review

Grundy SM, Hansen B, Smith SC Jr, Cleeman JI, Kahn RA, American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Diabetes Association. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* (2004) 109(4): 551-6

Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* (1987) 2(8549): 3-9

Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res* (1999) 40(6): 1053-63

Han KH, Hong KH, Park JH, Ko J, Kang DH, Choi KJ, Hong MK, Park SW, Park SJ. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1--mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation* (2004) 109(21): 2566-7

- Hankey GJ, Eikelbaum JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* (1999) 354: 407–413
- Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* (2002) 51(10): 3120-7
- Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* (2002) 91 281–91
- Hauner H, Köster I, von Ferber L. Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1989–2001. *Dtsch Med Wochenschr* (2003) 128: 2632–38
- Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM Study in healthy men. *Arterioscler Thromb* (1994) 14: 54–59
- Heller FR, Jamart J, Honore P, Derue G, Novik V, Galanti L, Parfonry A, Hondekijn JC, Buysschaert M. Serum lipoprotein(a) in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* (1993) 16(5): 819-23
- Herder C, Baumert J, Thorand B, Koenig W, de Jager W, Meisinger C, Illig T, Martin S, Kolb H. Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002. *Diabetologia* (2006) 49(5): 921-929
- Hiraga T, Kobayashi T, Okubo M, Nakanishi K, Sugimoto T, Ohashi Y, Murase T. Prospective study of lipoprotein(a) as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in patients with diabetes. *Diabetes Care* (1995) 18(2): 241-4
- Hoekstra JB, van Rijn HJ, Erkelens DW, Thijssen JH. C-peptide. *Diabetes Care* (1982) 5(4): 438-46. Review
- Holness CL, Simmons DL. Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily. *J Cell Sci* (1994) 107 (Pt 8): 2065-70
- Homocysteine Studies Collaborations C. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* (2002) 288: 2015-22
- Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type-2 diabetes : 5-year follow-up of the Hoorn Study. *Circulation* (2000) 101(13): 1506 11
- Horuk R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* (1994)15(5): 159-65
- Horuk R, Peiper SC. Chemokines: molecular double agents. *Curr Biol* (1996) 6(12): 1581-2
- Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* (2003) 92(4A): 10J-17J. Review
- Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE: Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* (2004) 53: 693–700

Huang ES, Meigs JB, Singer DE. The effect of interventions to prevent cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* (2001) 111(8): 633-42

Hughes A, McVerry BA, Wilkinson L, Goldstone AH, Lewis D, Bloom A. Diabetes, a hypercoagulable state? Hemostatic variables in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Acta Haematol* (1983) 69, 254-259

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* (1997) 96(12): 4219-25

Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol* (2002) 25(4):143-7

Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* (2001) 24(10): 1711-21

Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* (2001) 141(2): 211-7

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* (2001) 24(4): 683-9

Jaffé M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem* (1886) 10: 391-400

Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn study. *Diabetes* (2000) 49(3): 485-91

Jain SK, Nagi DK, Slavin BM, Lumb PJ, Yudkin JS. Insulin therapy in type 2 diabetic subjects suppresses plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity and proinsulin-like molecules independently of glycaemic control. *Diabet Med* (1993) 10(1): 27-32

Jude EB, Douglas JT, Anderson SG, Young MJ, Boulton AJ. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* (2002) 13(3): 185-189  
Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* (1991) 34: 457-462

Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardissonne JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients--relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost* (1989) 61(3): 370-3

Kannel WB. Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. *Lipids* (2005) 40(12): 1215-20. Review

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, et al. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* (1987) 258: 1183-1186

Kekalainen P, Sarlund H, Farin P, Kaukanen E, Yang X, Laakso M. Femoral atherosclerosis in middle-aged subjects: association with cardiovascular risk factors and insulin resistance. *Am J Epidemiol* (1996) 144(8): 742-8

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* (2006) 113(15): 1888-904

King IP, Aubert RE, Hermann WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* (1998) 21: 1414-31

Knobl P, Schernthaner G, Schnack C, Pietschmann P, Proidl S, Prager R, Vukovich T. Haemostatic abnormalities persist despite glycaemic improvement by insulin therapy in lean type 2 diabetic patients. *Thromb Haemost* (1994) 71(6): 692-7

Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models. *J Smooth Muscle Res* (2005) 41(6): 283-302. Review

Kostner GM, Krempler F. Lipoprotein(a). *Curr Opin Lipidol* (1992) 3: 279-84

Kostner GM, Gries A, Pometta M, Molinari E, Pichler P, Aicher H. Immunochemical determination of lipoprotein Lp(a): comparison of Laurell electrophoresis and ELISA. *Clin Chim Acta* (1990) 188: 187-92

Kowala MC, Recce R, Beyer S, Gu C, Valentine M. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis* (2000) 149(2): 323-30

Kowalska I, Straczkowski M, Szelachowska M, Kinalska I, Prokop J, et al. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism. *Metabolism* (2002) 51(6): 733-36

Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low density lipoprotein and triglycerides: A current review. *Am J Cardiol* (2000) 86 (Suppl): 5L-10L.

Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation

of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* (2002) 156(11): 1070-77

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* (2002) 288(21): 2709-16

Langman LJ, Cole DE. Homocysteine: Cholesterol of the 90s? *Clinica Chimica Acta* (1999) 286: 63-80

Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* (1991) 65(5): 859-73

Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, Nam MS, Lee KW. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* (2005) 69(2): 175-9

Lemos JA de, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes with acute coronary syndromes. *Circulation* (2003) 107: 690–695

Leonetti F, Iozzo P, Giaccari A, Sbraccia P, Buongiorno A, Tamburrano G, Andreani D. Absence of clinically overt atherosclerotic vascular disease and adverse changes in cardiovascular risk factors in 70 patients with insulinoma. *J Endocrinol Invest* (1993) 16(11): 875-80

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* (2002) 420(6917): 868-74. Review

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* (2001) 104: 365–72

Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2003) 169(2): 203-14. Review

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): 1865-70

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* (2006) 354(15): 1567-77

Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, et al. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* (1990) 10: 240–245

Lowe GD, Yarnell JW, Rumley A, Bainton D, Sweetnam PM. C-reactive protein, fibrin D- dimer, and incident ischemic heart disease in the Speedwell study: are inflammation and fibrin turnover linked in pathogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001) 21: 603–610

Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell YW, Rumley A, Rumley C, Bainton D, et al. C-Reactive Protein, Fibrin D-Dimer, and Risk of Ischemic Heart Disease: The Caerphilly and Speedwell Studies Arterioscler. Thromb Vasc Biol (2004) 24: 1957-1962

Luc G, Bard JM, Arveiler D, et al. Lipoprotein(a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. Atherosclerosis (2002) 163: 377–384.

Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. Circulation (2003) 108(13): 1655-61

Ma J, Hennekens CH, Ridker PM, et al. A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study. J Am Coll Cardiol (1999) 33: 1347–1352

Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. Lancet (2001) 358(9286): 971-6

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, Williams GR. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. Circulation (2004) 110(10): 1245-50

Malmberg K, Ryden L, Wedel H, Birkeland K, Bootsma A, Dickstein K, Efendic S, Fisher M, Hamsten A, Herlitz J, Hildebrandt P, MacLeod K, Laakso M, Torp-Pedersen C, Waldenstrom A; DIGAMI 2 Investigators. Intense metabolic control by means of insulin in patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction (DIGAMI 2): effects on mortality and morbidity. Eur Heart J (2005) 26(7):650-61

Malmberg K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group. BMJ (1997) 314(7093): 1512-5

May LT, Shaw JE, Khanna AK, Zabriskie JB, Sehgal PB. Marked cell-type-specific differences in glycosylation of human interleukin-6. Cytokine (1991) 3: 204-211

Mathonnet F, de Mazancourt P, Denninger MH, Morot M, Benattar N, Giudicelli Y. Role of factor VIII on activated protein C resistance ratio in inflammatory diseases. Br J Haematol (1996) 95(2): 423-5

Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, et al. Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. Heart (2001) 85(5): 571-75

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol (1969) 56: 111-28

- McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* (1995) 270(19): 11025-8
- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* (1983) 29(3): 538-42
- Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet* (1993) 342: 1076–1079
- Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, Miltiadis NL, Bernardi VH, Fuster V, Fallon JT. Coronary plaque composition and macrophage infiltration in atherectomy specimen from patients with diabetes mellitus. *Circulation* (2000) 102: 2180–4
- Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med* (2003) 81(5): 321-6
- Mori E, Komori K, Yamaoka T, et al. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* (2002) 105(24): 2905-10
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* (2001) 44 Suppl 2: S14-2
- Moss SE, Klein R, Klein BE. Cause-specific mortality in a population-based study of diabetes. *Am J Public Health* (1991) 81(9): 1158-62
- Moussavi N, Renier G, Roussin A, Mamputu JC, Buithieu J, Serri O. Lack of concordance between plasma markers of cardiovascular risk and intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* (2004) 6(1): 69-77
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* (1999) 274 (31): 21491-94
- Nagel T, Resnick N, Atkinson W J, Dewey CF, Gimbrone MA. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* (1994) 94: 885–91
- Nakanishi S, Yamane K, Kamei N, Okubo M, Kohno N. Elevated C-reactive protein is a risk factor for the development of type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* (2003) 26: 2754–2757
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* (2005) 353(25): 2643-53

Neeley WE. Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *Clin Chem* (1972) 18(6): 509-15

Nelken NA, Coughlin SR, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* (1991) 88(4): 1121-7

Nesto RW. Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: Current concepts. *Am J Med* (2004) 116: 11S-22S

Newby AC, Libby P, van der Wal AC. Plaque instability - the real challenge for atherosclerosis research in the next decade? *Cardiovasc Res* (1999) 41(2): 321-2

Newman DJ, Henneberry H, Price CP. Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem* (1992) 29 (Pt1): 22-42. Review

Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kübler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* (1999) 82 (Suppl): 14-18

Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA, Todo Y, Horita T, Nohara A, Higashikata T, Inazu A, et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* (2001) 39(5): 380-4

Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* (1997) 337: 230-6

O'Connell BJ, Genert J. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* (2001) 104: 1978-83

Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* (1995) 28(2): 103-17

Oshima S, Ogawa H, Hokimoto S, et al. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 antigen levels and the risk of restenosis after coronary stent implantation. *Jpn Circ J*.2001;65(4):261-4.

Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes* (1997) 46(12): 2096-101

Palareti G. Fibrinogen / Fibrin Degradation Products: Pathophysiology and Clinical Application. *Fibrinolysis* (1993) 7: 60-61

Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* (2004) 109(5): 647-55

Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kubler W, Bode C. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. Arterioscler Thromb Vasc Biol (1997) 17(3): 505-12

Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia (1997) 40: 1286–1292

Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? Diabetologia (1998) 41: 1241–1248

Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care (2004) 27(3): 813-23. Review

Pober JS, Gimbrone MA. Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol (1993) 11: 767-804

Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic cells: implications for vascular disease. Circulation (2001) 103: 2717-23

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin-6 and the risk of developing type 2 diabetes mellitus. JAMA (2001) 286: 327-334

Reverter JL, Reverter JC, Tassies D, Rius F, Monteagudo J et al. Thrombomodulin and induced tissue factor expression on monocytes as markers of diabetic microangiopathy : a prospective study on hemostasis and lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Hematol (1997) 56: 93-99

Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. Lancet (1998) 351(9096): 88-92

Ridker PM, Hennekens CH, Cerskus A et al. Plasma concentration of cross-linked fibrin degradation product ( D-Dimer ) and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. Circulation (1994) 90: 2236-2240

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. Circulation (2004) 109 (25 Suppl 1): IV6-19. Review

Ritchie DG, Levy BA, Adams MA, Fuller GM. Regulation of fibrinogen and fibrin: an indirect feedback pathway. Proc Natl Acad Sci U S A (1982) 79: 1530–1534

Robson SC, Shephard EG, Kirsch RE. Fibrin degradation product D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1 $\beta$ , IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. Br J Haematol (1994) 86: 322–326

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* (1999) 340(2): 115-26. Review

Ryysy L, Yki-Jarvinen H. Improvement of glycemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes. *Diabetes Care* (2001) 24(3): 549-54

Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, et al. Nontraditional Risk Factors for Coronary Heart Disease Incidence among Persons with Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med* (2000) 133: 81-91

Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation / regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* (1988) 4: 93-126

Schaumberg DA, Glynn RJ, Jenkins AJ, Lyons TJ, Rifai N, Manson JE, Ridker PM, Nathan DM. Effect of intensive glycemic control on levels of markers of inflammation in type 1 diabetes mellitus in the diabetes control and complications trial. *Circulation* (2005) 111(19): 2446-53

Schmidt AM, Hori O, Chen JX. Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* (1995) 96: 1395-403

Schneider DJ, Sobel BE. Augmentation of synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin and insulin-like growth factor type I: implications for vascular disease in hyperinsulinemic states. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88(22): 9959-63

Shai I, Schulze MB, Manson JE, Stampfer MJ, Rifai N, Hu FB. A prospective study of lipoprotein(a) and risk of coronary heart disease among women with type 2 diabetes. *Diabetologia* (2005) 48(8): 1469-76

Shichiri M, Kishikawa H, Ohkubo Y, Wake N. Long-term results of the Kumamoto Study on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* (2000) 23 Suppl 2: B21-9

Simeoni E, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Ruiz J, Fleury S, Boehm BO, Marz W, Vassalli G. Association between the A-2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* (2004) 47(9): 1574-80

Sixt S, Schuler G, Niebauer J. Diabetes mellitus Typ 2 und koronare Herzkrankheit. *Dtsch Med Wochenschr* (2004) 129: 1385-9

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Potsdam Study. *Diabetes* (2003) 52: 812-817

Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* (1986) 137(6): 1893-6

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* (1990) 346(6283): 425-34

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* (1994) 76(2): 301-14

Steiner M, Reinhardt KM, Blann AD. Soluble adhesion molecules in NIDDM: increased concentration, relation to glycometabolic control and possible pathophysiological significance. *Diabetologia* (1996) 39(7): 868-70

Stout RW. Hyperinsulinemia and atherosclerosis. *Diabetes* (1996) 45 Suppl 3: S45-6. Review

Stout RW. Insulin and atherogenesis. *Eur J Epidemiol* (1992) 8 Suppl 1: 134-5

Stout RW. Insulin as a mitogenic factor: role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Med* (1991) 90(2A): 62S-65S

Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* (1995) 41(5): 717-23

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* (2003) 108(16): 1917-23. Review.

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* (2003) 108(17): 2041-8. Review.

Takebayashi K, Aso Y, Inukai T. Initiation of insulin therapy reduces serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* (2004) 53: 693-699

The University Group Diabetes Program. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. V. Evaluation of pheniformin therapy. *Diabetes* (1975) 24 Suppl 1: 65-184

Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* (1998) 98(21): 2241-7

Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW, for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study

Group: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with stable angina pectoris. *N Engl J Med* (1995) 332: 635–641

Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W. C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984–1998. *Arch Intern Med* (2003)163: 93–99

Thorand B, Baumert J, Chambless L, Meisinger C, Kolb H, Doring A, Lowel H, Koenig W; MONICA/KORA Study Group. Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle-aged men and women from the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26(2): 398-405

Toba H, Gomyo E, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, Sawai N, Tsukamoto R, Asayama J, Kobara M, Nakata T. Hyperinsulinaemia increases the gene expression of endothelial nitric oxide synthase and the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2006) 33(5-6): 440-7

Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93: 10417–22

Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Curr Opin Cardiol* (2003) 18(6): 471-8. Review

Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol* (1969) 22(2): 246

UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* (1998) 352: 837–853

Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* (2005) 3(8): 1879- 83. Review

Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2005) 14(1): 33-7. Review

Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE . Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* (2001 ) 9: 414-417

Vukovich T, Proidl S, Knobl P, Teufelsbauer H, Schnack C, Schernthaner G. The effect of insulin treatment on the balance between tissue plasminogen activator and

plasminogen activator inhibitor-1 in type 2 diabetic patients. *Thromb Haemost* (1992) 68(3): 253-6

Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* (2002) 325: 1202

Wallen NH, Held C, Rehnqvist N, Hjemsdahl P. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or non-fatal myocardial infarction. *Eur Heart J* (1999) 20(14): 1039-43

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* (1998) 338: 1042-1050

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* (1997) 91: 439-442

Wilcox JN, Noguchi S, Casanova J. Extrahepatic synthesis of factor VII in human atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003) 23: 136–141

Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, et al. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* (1984) 311: 501–505

Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* (1988) 6: 381-405

Wingard DL, Barrett-Connor EL, Ferrara A. Is insulin really a heart disease risk factor. *Diabetes Care* (1995) 18(9): 1299-304. Review

Wolf HU, Lang W, Zander R. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. *Clin Chim Acta* (1984) 136(1): 95-104

Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* (2002) 287(19): 2563-9

Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* (2003) 290(16): 2159-67

Yki-Jarvinen H. Insulin resistance and endothelial dysfunction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2003) 17(3): 411-30. Review

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) 88(12): 5252-6

Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol* (1991) 305: 47-56

Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1: structure and function. *Cytokines* (1992) 4: 131-52

Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* (2002) 88: 554–67

Yudkin JS, Panahloo A, Stehouwer C, Emeis JJ, Bulmer K, Mohamed-Ali V, Denver AE. The influence of improved glycaemic control with insulin and sulphonylureas on acute phase and endothelial markers in type II diabetic subjects. *Diabetologia* (2000) 43: 1099–1106

Zander R, Lang W, Wolf HU. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. *Clin Chim Acta* (1984) 136(1): 83-93

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme –Hemmer
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ApoB	Apolipoprotein B
AGE	Advanced glycation end products
ApoE	Apolipoprotein E
Ap-1	activator protein-1
ASS	Acetylsalicylsäure
AT2-Blocker	Angiotensin 2-Blocker
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutglukose
Ca	Calcium
CCR-2	Cystein-cystein -Chemokine- Rezeptor 2
EGR-1	early growth response-1
ET-1	Endothelin-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb <sub>A1C</sub>	glykosiliertes Hämoglobin
HDL	High-density-lipoprotein
HCY	Homocystein
hs-CRP	high-sensitives C-reaktives Protein
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule -1
IL-6	Interleukin-6
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density-lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte-Chemoattractant-Protein-1
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NF-κB	Nuclear Faktor-kappa B
nm	nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NPH	Neutrales Protamin Hagedorn
n.s.	nicht signifikant
OAD	orale Antidiabetika
Ox-LDL	oxidiertes-LDL
p	Wahrscheinlichkeit
PAI-1	plasminogen activator-inhibitor-1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet-derived Growth Faktor
PEG	Polyäthylenglykol
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species (freie Sauerstoffradikale)
SD	Standardabweichung
SMC	Smooth Muscle Cells (glatte Muskelzellen)
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
t-PA	tissue-type plasminogen activator
u-PA	Urokinase
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule -1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor

## 8. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit, direkt oder indirekt, unterstützt haben, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Clemens von Schacky möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die konstruktive Hilfe bei der Durchsicht dieser Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. med. Rüdiger Landgraf für seine vielen Anregungen diese Arbeit betreffend sowie seine umfangreiche Unterstützung und Förderung, die weit über eine Doktorarbeit hinausgingen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Georg Meier für die vielen wertvollen Ratschläge und seine Hilfe bei der Erstellung der Arbeit sowie seine hervorragende Betreuung auf dem Entstehungsweg dieser.

Außerdem ein herzlicher Dank an Frau Rosemarie Kiefl, Frau Kathie Aimer und Frau Christine Grünfeld für die intensive Einarbeitung, Betreuung und Hilfe im Labor sowie darüber hinaus.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen der diabetologischen und hämostaseologischen Abteilung der Medizinischen Klinik-Innenstadt des Klinikums der Universität München für die freundliche Atmosphäre und ihr hilfreiches Entgegenkommen bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei allen Probanden für ihre Bereitwilligkeit bedanken, an dieser klinischen Untersuchung teilzunehmen.

Meiner Mutter bin ich dankbar, dass sie mich in meiner Entscheidung zur Promotion immer bestärkt hat. Ohne ihre Hilfe wäre ich nicht bis hierher gekommen.

Meiner Tante Rachele gilt mein Dank für ihre Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Farschid und Joachim sowie allen meinen Freunden für die Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre.