

Diplomarbeit

**Vergleich verschiedener Methoden zur Messung
der Endothelfunktion**

eingereicht von

Jacqueline Lenz

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Harald Sourij, MBA

Dr. scient. med. Norbert Tripolt, MSc. BSc.

Graz, 21.06.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 21.06.2022

Jacqueline Lenz eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich beim Verfassen meiner Diplomarbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt natürlich meinen beiden Betreuern, Univ.-Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Harald Sourij, MBA und Dr. scient. med. Norbert Tripolt, MSc., BSc. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und konnten mit Ihrer Expertise diese Arbeit fachlich sehr aufwerten. Ich möchte mich auch bei meiner Familie sowie bei meinem Freund für die Unterstützung während meiner Studienzeit herzlich bedanken. Abschließend möchte ich dem gesamten Forschungsteam für interdisziplinäre metabolische Medizin meinen Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN	3
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	8
ABSTRACT	10
1. EINLEITUNG	12
1.2 DAS GESUNDE ENDOTHEL	13
1.3 ENDOTHELDYSFUNKTION	14
1.4 ATHEROSKLEROSE	15
1.5 ATHEROSKLEROSE UND KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN	16
1.6 DIE ENDOTHELDYSFUNKTION ALS SCHLÜSSELROLLE IN DER PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE	17
1.6.1 ENDOTHELDYSFUNKTION BEI KORONARER HERZERKRANKUNG	18
1.6.2 ENDOTHELDYSFUNKTION UND DIABETES MELLITUS	19
1.7 MESSUNGEN DER ENDOTHELFUNKTION:	21
1.7.1 INVASIVE METHODEN ZUR MESSUNG DER ENDOTHELFUNKTION:	21
1.7.2 NICHT INVASIVE METHODEN ZUR MESSUNG DER ENDOTHELFUNKTION	22
1.7.2.1 DIE FLUSSVERMITTELTE VASODILATATION	22
1.7.2.2 PERIPHERE ARTERIELLE TONOMETRIE.....	23
1.7.2.3 PWV	24
1.8 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESE	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 STUDIENPOPULATION	26
2.1.1 EINSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 1 (GESUNDE PERSONEN)	26
2.1.2. AUSSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 1 (GESUNDE PERSONEN)	27
2.1.3 EINSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 2 (PATIENT*INNEN MIT T2DM).....	27
2.1.4 AUSSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 2 (PATIENT*INNEN MIT T2DM).....	27
2.1.5 EINSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 3 (PATIENT*INNEN MIT ATHEROSKLEROSE)	27
2.1.6 AUSSCHLUSSKRITERIEN KOHORTE 3 (PATIENT*INNEN MIT ATHEROSKLEROSE)	28
2.2 VORZEITIGE BEENDIGUNG DER STUDIE	28
2.3 STUDIENDESIGN	28
2.4 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	31
2.4.1 PHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNG	31
2.4.2 ERHEBUNG DER VITALPARAMETER	31
2.4.3 BLUTENTNAHME UND LAGERUNG	31
2.4.4 FMD-MESSUNG.....	32
2.4.5 ENDO-PAT	33

2.4.6 PULSWELLENGESCHWINDIGKEIT.....	36
2.5 STATISTISCHE ANALYSE	36
<u>3. ERGEBNISSE.....</u>	<u>37</u>
3.1 BASELINE CHARAKTERISTIKA DER STUDIENKOHORTEN.....	37
3.2 VORERKRANKUNGEN UND BEGLEITMEDIKATION.....	38
3.3 PULSWELLENANALYSE.....	40
3.3.1 PULSWELLENGESCHWINDIGKEIT.....	41
3.3.2 PULSDRUCKAMPLIFIKATION	41
3.3.3 SCHLAGVOLUMEN	42
3.3.4 HERZMINUTENVOLUMEN	42
3.3.5 TOTALER PERIPHERER WIDERSTAND	43
3.3.6 HERZINDEX	43
3.3.7 AUGMENTATIONSDRUCK	44
3.3.8 REFLEXIONSKOEFFIZIENT	44
3.3.9 AUGMENTATIONSINDEX	45
3.4 FLUSSVERMITTELTE VASODILATATION.....	45
<u>4. DISKUSSION.....</u>	<u>47</u>
<u>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>50</u>

Glossar und Abkürzungen

AI Augmentationsindex

BMI Body Mass Index

CVDs kardiovaskuläre Erkrankungen

EDHF endothelialer hyperpolarisierender Faktor

EDRF endothelialer Relaxationsfaktor

Endo-PAT periphere arterielle Tonometrie

eNOS endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

ET-1 Endothelin-1

FMD flussvermittelte Vasodilatation

GIRO Grazer Diabetesregister für Biomarkerforschung

HI Herzindex

HMV Herzminutenvolumen

KHK koronare Herzerkrankung

LDL Low-Density Lipoprotein

NMD endothelunabhängige Vasodilatation

NO Stickstoffmonoxid

paVK periphere arterielle Verschlusskrankheit

PGI₂ Prostacyclin

PWV Pulswellengeschwindigkeit

RC Reflexionskoeffizient

RHI reaktiver Hyperämie Index

SV Schlagvolumen

T2DM Typ 2 Diabetes Mellitus

TPR totaler peripherer Widerstand

TXA₂ Thromboxan

zAVK zerebrale arterielle Verschlusskrankheit

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ENDOTHELDYSFUNKTION (17)	14
ABBILDUNG 2: RISIKOFAKTOREN FÜR KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN (8)	17
ABBILDUNG 3: DIABETES MELLITUS UND ENDOTHELDYSFUNKTION (58).....	20
ABBILDUNG 4: METHODEN ZUR MESSUNG DER ENDOTHELFUNKTION (74)	24
ABBILDUNG 5: STUDIENABLAUF.....	29
ABBILDUNG 6: VISITENÜBERSICHT	29
ABBILDUNG 7: FMD MESSUNG DER A. BRACHIALIS (91).....	33
ABBILDUNG 8: FORMELN ZUR BERECHNUNG DER FMD UND NMD (92)	33
ABBILDUNG 9: PAT-SIGNAL (93).....	35
ABBILDUNG 10: PULSWELLENGESCHWINDIGKEIT	41
ABBILDUNG 11: PULSDRUCKAMPLIFIKATION	41
ABBILDUNG 12: SCHLAGVOLUMEN.....	42
ABBILDUNG 13: HERZMINUTENVOLUMEN	42
ABBILDUNG 14: PERIPHERER WIDERSTAND.....	43
ABBILDUNG 15: HERZINDEX	43
ABBILDUNG 16: AUGMENTATIONSDRUCK.....	44
ABBILDUNG 17: REFLEXIONSKOEFFIZIENT	44
ABBILDUNG 18: AUGMENTATIONSINDEX	45
ABBILDUNG 19: FMD (%).....	46
ABBILDUNG 20: NMD (%).....	46

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 BEGRIFFSERKLÄRUNG: ENDOTHEL.....	13
TABELLE 2 BEGRIFFSERKLÄRUNG: ENDOTHELDYSFUNKTION	14
TABELLE 3 BEGRIFFSERKLÄRUNG: ATHEROSKLEROSE	15
TABELLE 4 BEGRIFFSERKLÄRUNG: KORONARE HERZERKRANKUNG.....	18
TABELLE 5: BASELINE CHARAKTERISTIKA.....	37
TABELLE 6: VORERKRANKUNGEN	38
TABELLE 7: MEDIKATION	39
TABELLE 8: PULSWELLENANALYSE	40
TABELLE 9: FLUSSVERMITTELTE VASODILATATION	45

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Funktion des Gefäßendothels stellt einen wichtigen Prädiktor für das Risiko von kardiovaskulären Ereignissen in Hochrisikogruppen dar. Zur nichtinvasiven Beurteilung der Endothelfunktion kommen häufig Methoden wie die flussvermittelte Vasodilatation (FMD), die endothelunabhängige Dilatation (NMD) sowie die periphere arterielle Tonometrie (Endo-PAT) zur Anwendung. Mittels Pulswellengeschwindigkeit (PWV) kann zudem die Gefäßsteifigkeit beurteilt werden.

Ziel: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den direkten Vergleich nicht invasiver Methoden zur Messung der Endothelfunktion in einer gesunden Kohorte, einer Kohorte mit Atherosklerose und einer Kohorte von Menschen mit T2DM herzustellen und die Ergebnisse dieser drei Gruppen miteinander zu vergleichen.

Material und Methoden: In dieser monozentrischen 3-armigen Studie wurden 60 Personen in 3 Kohorten zu je 20 Personen eingeschlossen. Kohorte 1 (n=20, 13 weiblich, Alter 32 ± 9 Jahre) bestand aus gesunden Personen, Kohorte 2 (n=20, 13 Frauen, Alter 63 ± 7 Jahre) umfasste Patient*innen mit T2DM und Kohorte 3 (n=20, 8 Frauen, Alter 59 ± 7 Jahre) bildete Patient*innen mit Atherosklerose ab. Die Proband*innen der drei Kohorten unterzogen sich denselben nicht-invasiven Messmethoden zur Evaluierung der Endothelfunktion. Im Rahmen einer Ultraschalluntersuchung der Brachialarterie erfolgte die Messung der FMD sowie der NMD nach Applikation von Nitroglycerin. Die Pulswellenanalyse, einschließlich Aorten-PWV, Augmentationsindex und Pulsdruck, erfolgte durch das oszillometrische Gerät Mobil-O-Graph® und die Auswertung durch eine automatisierte Analyse.

Ergebnisse: Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der PWV im Vergleich aller Kohorten ($p < 0,001$) als auch im Vergleich zwischen Kohorte 1 mit Kohorte 2 ($p < 0,001$) und Kohorte 3 ($p < 0,001$). Die FMD war in der gesunden Kohorte am höchsten ($6,5 \pm 4,1\%$) und in der T2DM Kohorte am niedrigsten ($2,0 \pm 4,8\%$). In der Kohorte 3 betrug die FMD im Durchschnitt $4,5 \pm 3,6\%$. Die FMD zeigte im Vergleich aller Kohorten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,006$). Auch der Unterschied zwischen der Kohorte 1 und der Kohorte 2 war statistisch signifikant ($p = 0,006$). Die

NMD zeigte weder im Vergleich aller Kohorten noch im Vergleich der einzelnen Kohorten einen statistisch signifikanten Unterschied.

Schlussfolgerung: Die Studienergebnisse zeigen, dass sowohl Patient*innen mit T2DM als auch Patient*innen mit Atherosklerose eine erhöhte Gefäßsteifigkeit aufweisen. Entgegen unserer Annahme, dass Patient*innen mit Atherosklerose die niedrigste FMD aufweisen, wurde in unserer Studie der niedrigste FMD-Wert in der Kohorte der Patient*innen mit T2DM gemessen. Im Vergleich zur FMD ergab die Messung der NMD keine signifikanten Unterschiede in den Kohorten.

Abstract

Introduction: The function of the vascular endothelium is a clear marker for the risk of cardiovascular events in high-risk groups. Non-invasive methods such as flow-mediated vasodilation (FMD), endothelium-independent dilatation (NMD) and peripheral arterial tonometry (Endo-PAT) are often used to assess endothelial function. Vascular stiffness can be determined using pulse wave velocity (PWV).

Aim: The aim of the present work was to make a direct comparison of non-invasive methods for measuring endothelial function in a healthy cohort, a cohort with atherosclerosis and a cohort of people with T2DM and to compare the results of these three groups with each other.

Material and Methods: 60 people were included in this monocentric, 3-armed study. The study population was divided into 3 cohorts of 20 people each. Cohort 1 (n=20, 13 women, age 32 ± 9 years) consisted of healthy individuals, cohort 2 (n=20, 13 women, age 63 ± 7 years) comprised 20 patients with T2DM and cohort 3 (n=20, 8 women, age 59 ± 7 years) consisted of patients with atherosclerosis. All subjects of the cohorts underwent non-invasive measurement methods to evaluate endothelial function. The FMD and the NMD after the application of nitroglycerin, were measured by ultrasound of the brachial artery. Pulse wave analysis, including aortic PWV, augmentation index and pulse pressure, was measured and calculated via the Mobil-O-Graph® oscillometric device by automated analysis.

Results: There are statistically significant differences in the PWV in comparison of all cohorts ($p < 0.001$) and in comparison between cohort 1 and cohort 2 ($p < 0.001$) or cohort 3 ($p < 0.001$). FMD was highest in the healthy cohort ($6.5 \pm 4.1\%$) and lowest in the T2DM cohort ($2.0 \pm 4.8\%$). In cohort 3, FMD average was $4.5 \pm 3.6\%$. The FMD showed a statistically significant difference in comparison of all cohorts ($p = 0.006$). The difference between cohort 1 and cohort 2 was also statistically significant ($p = 0.006$). The NMD did not show a statistically significant difference either when comparing all cohorts or when comparing the individual cohorts.

Conclusion: The study results show that patients with T2DM as well as patients with atherosclerosis have increased vascular stiffness. Contrary to our assumption

that patients with atherosclerosis have the lowest FMD, in our study the lowest FMD value was measured in the cohort with T2DM patients. The measurement of NMD did not reveal any significant differences between the cohorts.

1. Einleitung

Die Veränderungen der gesunden Endothelfunktion spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose, indem sie die Progression von Plaques und das Auftreten von atherosklerotischen Komplikationen begünstigen (1). Aufgrund der Tatsache, dass die endotheliale Dysfunktion mit dem Auftreten von Atherosklerose assoziiert ist, könnte die Messung der Endothelfunktion als nützlicher Marker zur Prognose des kardiovaskulären Risikos herangezogen werden (2). Zur Beurteilung des Funktionszustandes des Endothels werden häufig nichtinvasive Methoden, wie die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) der A. brachialis und die periphere arterielle Tonometrie (Endo-PAT) verwendet. Diese Messungen zeigen eine gute Korrelation mit einer beeinträchtigten Gefäßfunktion in den Koronararterien und können daher ein früher Indikator für kardiovaskuläre Erkrankungen sein (3, 4). Auch die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) stellt einen nützlichen Parameter zur Beurteilung der Gefäße, insbesondere der Steifigkeit, dar (5).

Während die oben genannten Methoden früher verwendet wurden, um die Endothelfunktion in einer Reihe verschiedener Populationen zu beurteilen, erfolgte bisher kein direkter Vergleich dieser Methoden in einer gesunden Kohorte, einer Kohorte von Patient*innen mit Atherosklerose und einer Kohorte von Patient*innen mit Typ 2 Diabetes. Ziel dieser Studie ist es den direkten Vergleich der FMD und PWV innerhalb verschiedener Kohorten mit unterschiedlichem Grad an vaskulärer Dysfunktion darzustellen. Die Endo-PAT2000 Ergebnisse waren zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit noch nicht vorliegend.

In den folgenden Kapiteln wird auf die Funktion des gesunden Endothels, die Endotheldysfunktion, insbesondere in Bezug auf die Atherosklerose, sowie die unterschiedlichen Messmethoden zur Beurteilung der Gefäßfunktion eingegangen. Abschließend werden die Ergebnisse der „Competition-Studie“ erläutert.

1.2 Das gesunde Endothel

Tabelle 1 Begriffserklärung: Endothel

Endothel	„Das Endothel ist eine Zellschicht, die sämtliche Blutgefäße auskleidet und wichtige Funktionen in verschiedenen biologische Systemen des Blutes übernimmt“ (6).
-----------------	--

Eine der Hauptfunktionen des Endothels ist die Gefäßregulation durch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen. Zu den vasodilatatorischen Faktoren zählen Prostacyclin (PGI_2), Stickstoffmonoxid (NO) und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF). Thromboxan (TXA_2) und Endothelin-1 (ET-1) wirken vasokonstriktorisches (7).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus spielt der Neurotransmitter Acetylcholin, welcher bei intaktem Endothel zu einer Vasodilatation der Gefäße führt und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus den Endothelzellen fördert. In einem Experiment beschrieb Furchgott 1980, dass Acetylcholin ein intaktes Endothel benötigt, um eine Vasodilatation herbeizuführen und in Endothelzellen bewirkt, dass die Freisetzung des endothelialen Relaxationsfaktors (EDRF) stimuliert wird (8). Später wurde EDRF als NO, welches durch die NO-Synthase gebildet wird, identifiziert (9, 10).

Die Endothelzellen übernehmen durch die Bildung von vasoaktiven Substanzen nicht nur eine wichtige Funktion in der Regulation des Gefäßtonus, sondern spielen auch eine Rolle bei Entzündungsprozessen, indem sie die Anlagerung von Leukozyten an das Endothel verhindern können (11, 12).

Außerdem hemmen sie die Proliferation von glatten Muskelzellen (13) und die Thrombozytenaggregation (14). Alle diese Prozesse verhindern das Entstehen und/oder das Fortschreiten der Atherosklerose (15).

1.3 Endotheldysfunktion

Tabelle 2 Begriffserklärung: Endotheldysfunktion

Endotheldysfunktion	Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Substanzen. Im Rahmen der Endotheldysfunktion sind vasodilatatorisch wirkende Substanzen, insbesondere NO, vermindert, während vasokonstriktorisches Substanzen vermehrt vorhanden sind (16).
----------------------------	--

Die verminderte Fähigkeit der Dilatation der Gefäße ist charakteristisch für eine Störung der Endothelfunktion. Zudem kommt es im Rahmen der Endotheldysfunktion zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels, einer Förderung der Thrombozytenaggregation sowie der Adhäsion von Leukozyten und der Zytokinbildung.

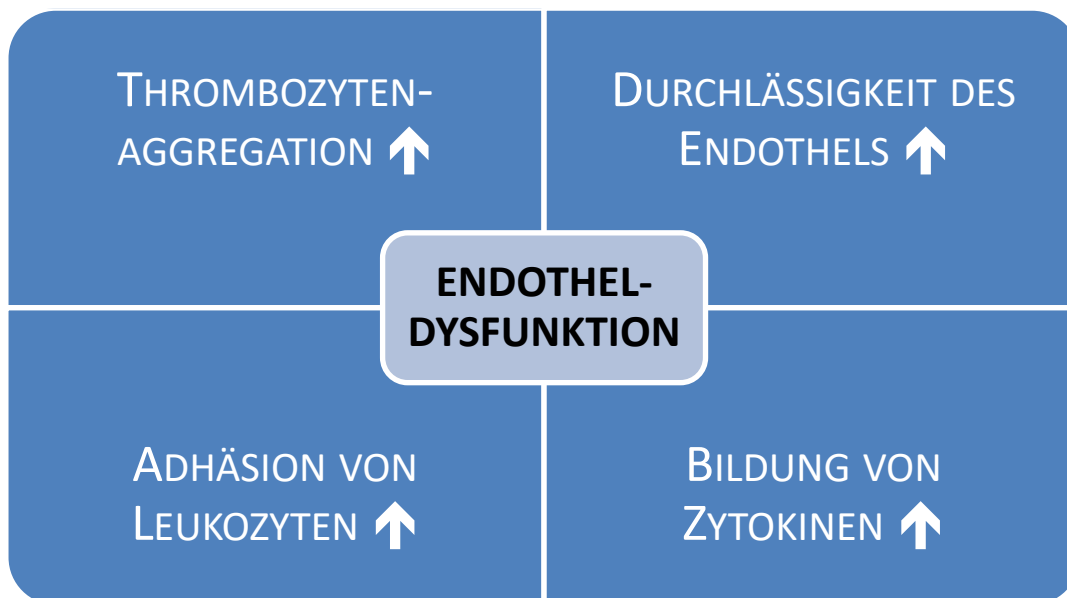


Abbildung 1: Endotheldysfunktion (17)

Alle diese Prozesse tragen zur Entstehung und Progression von atherosklerotischen Erkrankungen bei und erhöhen das Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (17).

1.4 Atherosklerose

Tabelle 3 Begriffserklärung: Atherosklerose

Atherosklerose	Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen pathologischen Prozess, der zu Erkrankungen der Koronar-, Gehirn- und peripheren Arterien oder der Aorta führt (18, 19).
-----------------------	--

Die Atherosklerose charakterisiert sich durch das Auftreten von Plaques in den Arterien, wodurch es zur Verengung des Gefäßlumens kommt und folglich der Blutfluss eingeschränkt wird (18).

Zu den häufigsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose zählen Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Insult und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Atherosklerotische Läsionen bilden sich vor allem in der Intima der mittelgroßen und großen Arterien, insbesondere an Gefäßverzweigungen (20).

Die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques geschieht auf dem Boden von Entzündungsreizen durch Freisetzung von Zytokinen, Proliferation von glatten Muskelzellen, die Synthese von Bindegewebsmatrix und die Ansammlung von Entzündungszellen (Makrophagen) und Lipiden. Low-Density Lipoprotein (LDL) aus dem Blut kann in die Arterienwand eingelagert werden und durch freie Radikale oder durch Leukozyten oxidiert werden. Dieses oxidierte LDL führt zu einer Entzündungsreaktion, wodurch Entzündungszellen, wie Monozyten und Makrophagen, angelockt werden. Die Makrophagen binden an das LDL und nehmen die oxidierten LDL Partikel auf und verwandeln sich in Schaumzellen. Diese setzen zahlreiche Zytokine und Entzündungsmediatoren frei. Folglich werden weitere Zellen angelockt und es kommt zur Proliferation von glatten Muskelzellen, wodurch atherosklerotische Plaques entstehen. Werden solche Plaques instabil, besteht die Gefahr einer Ruptur und in weiterer Folge kann es durch die rupturierte Plaque zu einem thrombotischen Verschluss einer Arterie kommen (21).

Eine zentrale Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose wird dem Endothel zugeschrieben (22).

1.5 Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen

CVDs stellen die Hauptursache der Todesfälle in der westlichen Welt dar, wobei die Atherosklerose – der Hauptgrund für Myokardinfarkte und zerebrale Infarkte – für die Mehrheit dieser Tode verantwortlich ist (23). Besorgniserregend ist die Tatsache, dass sich die Prävalenzzahlen von CVDs von 1990 bis 2019 weltweit beinahe verdoppelt haben. Auch die Anzahl der Todesfälle, welche kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben werden konnten, stieg in diesem Zeitraum von 12,1 Millionen auf 18,6 Millionen (24).

Neben der signifikant erhöhten Sterblichkeit bei Menschen mit CVDs schränkt das Vorhandensein von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein „Altern bei guter Gesundheit“ ein und geht mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität einher (25). Diese verringerte Lebensqualität drückt sich durch häufig beschriebene physische und psychische Symptome, wie Atemnot, Müdigkeit, Flüssigkeitseinlagerungen, Schlafstörungen, Depression, Schmerzen etc. aus (26). Zudem belastet die Behandlung von Patient*innen mit Atherosklerose Gesundheitssysteme, Krankenanstalten und Gesundheitsversicherungen mit enormen Kosten (27).

Bereits etablierte Strategien für Risikoassessment und Prävention zeigen gute Erfolge, um die Mortalitätszahlen von CVDs zu reduzieren (28). Umso wichtiger ist es, diese Bemühungen auszuweiten und intensiv fortzuführen. Die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung wird durch zahlreiche Risikofaktoren begünstigt. Zu den wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zählen arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Übergewicht, körperliche Inaktivität und eine ungesunde Ernährung (29).



Abbildung 2: Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (8)

Alle diese genannten Faktoren fördern die Entstehung der Atherosklerose, indem sie zu einer Schädigung des Endothels führen (30). Auch das Alter und das männliche Geschlecht sind prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose (18).

1.6 Die Endotheldysfunktion als Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und chronischer Nikotinabusus können zu einer Schädigung des Endothels führen (31-34). Mehrere gleichzeitig bestehende Risikofaktoren potenzieren die negativen Effekte, die auf die Funktion des Endothels einwirken, und verschlechtern somit die kardiovaskuläre Prognose (35).

Zahlreiche Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankung (KHK), chronische Herzinsuffizienz, pAVK als auch chronische Niereninsuffizienz gehen mit einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion einher (31, 36-39). Der wissenschaftliche Erkenntnisstand liefert auch Evidenz, dass eine Störung der Endothelfunktion eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Mikro- und Makroangiopathien bei Patient*innen mit Diabetes spielt (40). Zusätzlich trägt ein erhöhter oxidativer Stress zur Beeinträchtigung der Endothelfunktion bei und begünstigt die Atherogenese (41).

Aufgrund der Tatsache, dass die endotheliale Dysfunktion in einem starken Zusammenhang mit der Entstehung und Förderung der Atherosklerose steht,

könnte die Messung der Endothelfunktion ein nützlicher Prädiktor für die Prognose von kardiovaskulären Ereignissen sein (2, 42).

In einer Studie, welche mit 147 Patient*innen durchgeführt wurde, untersuchte man den Zusammenhang von Endotheldysfunktion mit der Progression von Atherosklerose sowie dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen. Das Studienergebnis zeigte, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion ein signifikant höheres Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen ergab (43).

1.6.1 Endotheldysfunktion bei koronarer Herzerkrankung

Tabelle 4 Begriffserklärung: koronare Herzerkrankung

Koronare Herz- erkrankung	Die koronare Herzkrankheit bezeichnet eine Erkrankung der Koronararterien, welche meist durch Arteriosklerose ausgelöst wird und mit einer reduzierten Durchblutung des Herzens einhergeht (44).
--------------------------------------	--

Bei KHK kommt es aufgrund einer Verminderung der Koronarreserven zu einer Beeinträchtigung der Durchblutung des Myokards, wodurch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot entsteht. Patient*innen mit KHK zeigen bei körperlichen Belastungen oder psychischer Erregung typische Angina pectoris Symptome aufgrund der verminderten Durchblutung des Herzmuskels. Im Rahmen von Angina pectoris treten typischerweise Schmerzen in der linken Brust mit Ausstrahlung in Arm und Hals auf (45). Aufgrund von arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße kommt es im Rahmen der KHK zu einer Gefäßverengung der großen proximalen arteriellen Herzgefäße. Eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im Rahmen der koronaren endothelialen Dysfunktion führt zusätzlich zu einer Einschränkung der Vasodilatation von epikardialen und mikrovaskulären Herzkranzgefäßen. Dies kann bei Patient*innen mit KHK zum Auftreten eines Myokardinfarkts führen (46).

Eine prospektive Studie zeigte, dass eine endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle in der Progression von koronarer Herzerkrankung spielt. 157

Personen mit milder KHK wurden, entsprechend ihrer Endothelfunktion, in 3 Gruppen eingeteilt. Patient*innen in der Gruppe 1 (normale Endothelfunktion) und in Gruppe 2 (milde Endothelfunktion) hatten am Ende der Follow-up Zeit nach 28 Monaten keine kardialen Ereignisse erlitten, während 6 Personen von 42 Personen in Gruppe 3 (schwere endotheliale Dysfunktion) ein kardiales Ereignis aufwiesen (47).

Es gibt jedoch auch Evidenz, dass eine endotheliale Dysfunktion in den Koronararterien, auch ohne das Vorliegen von relevanten Stenosen, das Auftreten von Angina pectoris begünstigt (48). Somit könnte die epikardiale und mikrovaskuläre endotheliale Dysfunktion der Herzkranzgefäße als unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von akuten kardiovaskulären Ereignissen, unabhängig davon, ob in der Angiographie nachweisbare atherosklerotische Läsionen in den Koronargefäßen vorliegen, dienen (49).

1.6.2 Endotheldysfunktion und Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (50, 51). Vaskuläre Erkrankungen sind nach wie vor die wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität bei Patient*innen mit Diabetes mellitus (52, 53).

Die endotheliale Dysfunktion ist mitursächlich für die Entstehung mikrovaskulärer und makrovaskulärer Gefäßkomplikationen. Als wichtigste mikrovaskuläre Komplikationen des Diabetes mellitus sind die diabetische Retinopathie und Neuropathie zu nennen, während makrovaskuläre Komplikationen die Koronararterien und peripheren Arterien umfassen und schließlich zu Erkrankungen wie KHK, pAVK und Insult führen können (54).

Eine endotheliale Dysfunktion konnte sowohl bei Patient*innen mit Typ 2 Diabetes als auch bei Patienten mit Typ 1 Diabetes beobachtet werden (55-57). Die metabolischen Begleiterscheinungen des Diabetes, wie chronische Hyperglykämie, Insulinresistenz und Dyslipidämie fördern ebenfalls die Entstehung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Verschiedene Pathomechanismen,

welche die Bioverfügbarkeit von NO verringern, führen bei Diabetes zu einer eingeschränkten Vasodilatation der Gefäße (58).

Bei Vorhandensein einer Hyperglykämie wird die Bildung von NO durch eine Blockade der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) vermindert. Außerdem führt ein erhöhter Blutzuckerspiegel zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen im Endothel und in den glatten Muskelzellen, wodurch eine Gefäßschädigung begünstigt wird (59). Aufgrund der Insulinresistenz kommt es zu einem Anstieg von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe, wodurch ebenfalls vermehrt Sauerstoffradikale gebildet werden (60, 61).

Oxidativer Stress wirkt sich negativ auf die Gefäßfunktion aus. Durch die freien Sauerstoffradikale kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gefäße in ihrer Fähigkeit der Tonusregulation, da Sauerstoffradikale die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid vermindern (41).

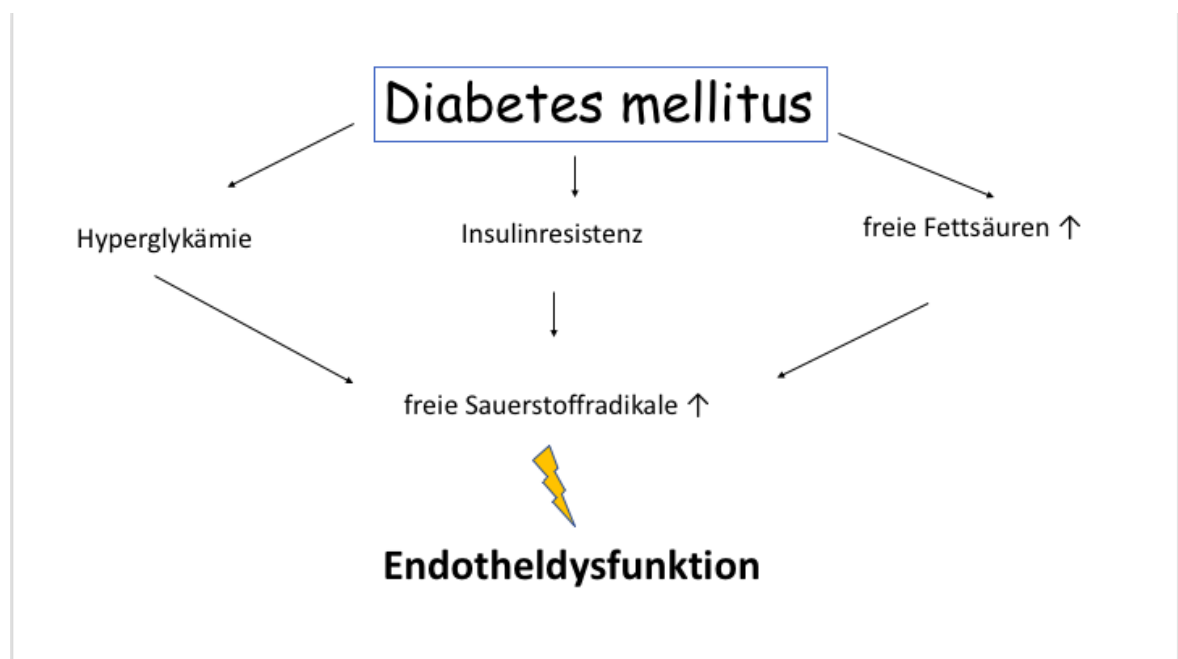


Abbildung 3: Diabetes mellitus und Endotheldysfunktion (58)

1.7 Messungen der Endothelfunktion:

Obwohl eine Routinemessung der Gefäßfunktion bisher nicht in den Guidelines für Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen enthalten ist, (62, 63) gibt es Evidenz, dass die Messung der Endothelfunktion im Rahmen der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen von Nutzen sein kann. Studien zeigen, dass die Messung der Endothelfunktion sowohl bei Personen mit bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen als auch bei Risikopersonen einen guten Prädiktor für das Auftreten zukünftiger kardialer Ereignisse darstellen kann (64, 65).

Aufgrund der Tatsache, dass die endotheliale Dysfunktion die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigt, sollte versucht werden, eine Endothelschädigung rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln, bevor die Atherosklerose und damit verbundene Komplikationen entstehen (66).

Hierbei können sowohl invasive als auch nicht-invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion zum Einsatz kommen, welchen unterschiedliche Funktionsprinzipien zugrunde liegen (67).

1.7.1 Invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion:

Die invasive Messung der Endothelfunktion erfolgt im Rahmen einer quantitativen Angiographie. Acetylcholin ist die häufigste vasodilatatorisch wirkende Substanz, welche in Experimenten und Studien zur invasiven Messung der Endothelfunktion verwendet wird (68, 69). Durch Bindung von Acetylcholin an die muskarinischen Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der eNOS, welche die Bildung von NO aus L-Arginin stimuliert (70).

Zur invasiven Messung der Endothelfunktion werden im Rahmen der quantitativen Angiographie vasoaktive Substanzen, wie Acetylcholin, in die Koronararterien injiziert und die Reaktion der Gefäße untersucht. Acetylcholin führt bei gesunder Endothelfunktion der Koronararterien zu einer Vasodilatation. Bei einer

Endothelschädigung liegt eine Störung dieses Mechanismus vor und die Reaktion verhält sich kontrovers. Es kommt zu einer Vasokonstriktion, da Acetylcholin direkt auf die darunterliegenden glatten Muskelzellen wirkt (68).

Da diese Technik zur Evaluierung der Endothelfunktion invasiv und sehr aufwendig ist, sollte sie jenen Personen vorbehalten sein, bei welchen eine Koronarangiographie indiziert ist (71).

Aus diesem Grund eignet sich diese Untersuchung nicht zur Routineuntersuchung von frühen Gefäßschädigungen oder zur Bestimmung des Fortschreitens und der Reversibilität von Endothelschäden (72). Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Endothelfunktion in den Koronararterien gut mit der Endothelfunktion in peripheren Arterien – wie etwa der Brachialarterie – korreliert, wurden verschiedene Methoden zur nicht-invasiven Bestimmung von Endothelveränderungen entwickelt, welche aufgrund ihrer „Nicht-Invasivität“ für alle Personen zur Anwendung kommen können und vergleichbare Resultate liefern (71, 73).

1.7.2 Nicht invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion

Zu den nichtinvasiven Methoden zur Evaluierung der Gefäßfunktion zählen die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) der A. brachialis und die periphere arterielle Tonometrie (Endo-PAT). Die FMD Messung, bei welcher die Endothelfunktion an der A. brachialis untersucht wird, spiegelt die Endothelfunktion im makrovaskulären Gefäßbett wider, während bei der PAT die Endothelfunktion in den kleinen Gefäßen des Fingers untersucht werden. Beiden Methoden ist gemeinsam, dass sie die vasodilatatorische Antwort des Endothels nach einer vorübergehenden Ischämie ermitteln (72, 74). Eine weitere nichtinvasive Methode ist die Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV)(75).

1.7.2.1 Die flussvermittelte Vasodilatation

Die flussvermittelte Vasodilatation als nichtinvasive Methode zur Bestimmung der Endothelfunktion wurde zum ersten Mal 1992 beschrieben (72). Heute stellt die

flussvermittelte Vasodilatation (FMD) ein häufig genutztes Verfahren zur Messung der Endothelfunktion dar und kommt sowohl bei Personen mit Herz-Kreislauferkrankungen, als auch bei Personen mit Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus zum Einsatz (76-80). Die FMD wird mithilfe einer Ultraschallbildgebung in der Arteria brachialis ermittelt. Zur Bestimmung der flussmedierten Vasodilatation wird eine Blutdruckmanschette am Oberarm fixiert, welche für 5 Minuten aufgeblasen bleibt. Das Lösen der Blutdruckmanschette führt zu einer reaktiven Hyperämie. Durch die Zunahme der Scherspannung kommt es zu einer endothelabhängigen flussvermittelten Vasodilatation der Brachialarterie (71).

Eine reduzierte FMD stellt nicht nur einen frühen Indikator für Atherosklerose dar, sondern zeigt auch ein signifikantes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen (80).

1.7.2.2 Periphere arterielle Tonometrie

Eine weitere Methode zur nichtinvasiven Messung der Endothelfunktion ist die periphere arterielle Tonometrie (Endo-PAT). Im Vergleich zur FMD Messung, bei welcher ein Ultraschallgerät benötigt wird, ist diese Messmethode untersucherunabhängig und auch billiger. Bei dieser Untersuchung werden mithilfe von plethysmographischen Sonden, welche an den Zeigefingern jeder Hand platziert werden, endothelvermittelte Änderungen der digitalen Pulswellenform während reaktiver Hyperämie aufgezeichnet (=PAT-Signal) und gemessen. Patient*innen mit einer koronaren endothelialen Dysfunktion zeigen im Vergleich zu Personen mit normaler koronarer Endothelfunktion einen niedrigeren PAT Index (81).

Die meisten invasiven als auch nicht-invasiven Messmethoden zur Evaluierung der Endothelfunktion basieren auf demselben Grundprinzip: Durch eine reaktive Hyperämie oder nach Injektion von vasoaktiven Substanzen kommt es in gesunden Arterien zu einer Vasodilatation aufgrund der Freisetzung von NO und/oder anderer vasodilatatorisch wirkender Faktoren (82).

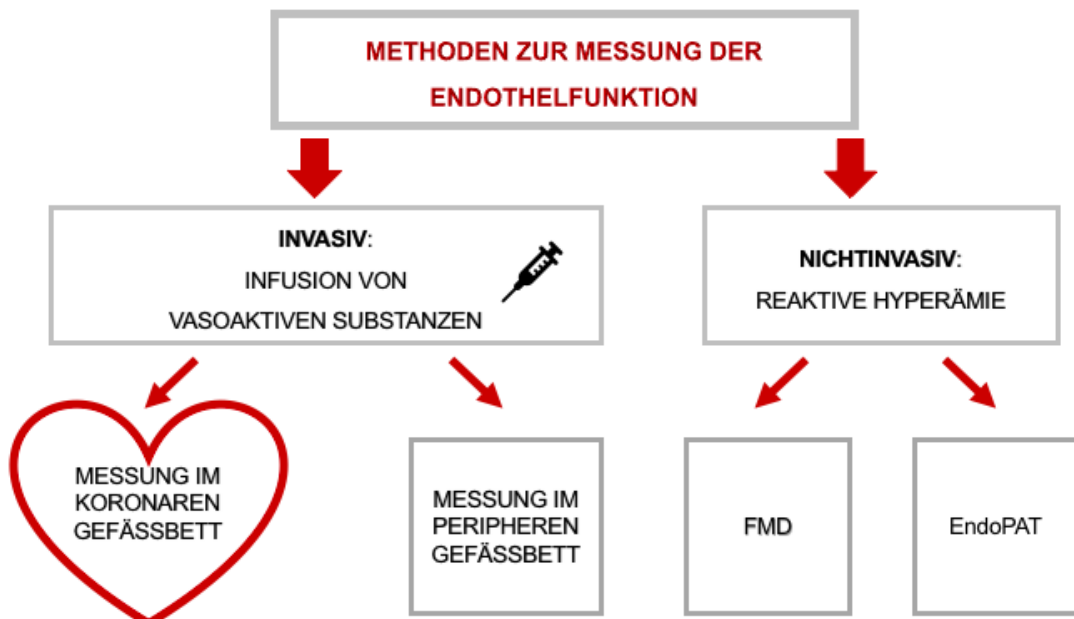


Abbildung 4: Methoden zur Messung der Endothelfunktion (74)

1.7.2.3 PWV

Die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung des kardiovaskulären Risikos und ist bei Patient*innen mit vaskulären Erkrankungen erhöht (83). Die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) ist jene Geschwindigkeit, mit der sich die Druckwelle, welche durch die Kontraktion des Herzens in der Systole entsteht, entlang der Arterien im Körper ausbreitet. Durch die Messung der PWV kann auf die Elastizität der Arterien geschlossen werden. Je höher die PWV, desto geringer ist die Dehnbarkeit der Gefäße. Verminderte Gefäßelastizität geht mit einer erhöhten Steifigkeit der Gefäße einher und trägt zur Entstehung von CVDs bei. Zudem gilt, dass die PWV in peripheren Arterien zunimmt. Als Goldstandard erfolgt die Messung der regionalen PWV in zwei unterschiedlichen Arterien, am häufigsten in der Karotis- und Femoralarterie (84). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die regionale PWV nur Durchschnittswerte über eine lange Distanz der Arterien generiert und keine Aussage über Veränderungen in kleinen Gefäßabschnitten liefert (85-87). Hierfür eignet sich die lokale PWV Messung, welche in einem kleinen Gefäßabschnitt durchgeführt wird und damit zur Früherkennung von Gefäßveränderungen geeignet ist (88, 89). Zur Erleichterung der nicht-invasiven Messung gibt es zahlreiche Geräte zur Messung

der PWV, welche auch die Möglichkeit einer genauen Analyse der Pulsdruckwellenform bieten (90).

1.8 Fragestellung und Hypothese

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der direkte Vergleich der Messmethoden in einer gesunden Kohorte, einer Kohorte mit Atherosklerose und einer Kohorte von Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 2. Folgende Fragen bezüglich unterschiedlicher Messmethoden der Endothelfunktion werden in dieser Arbeit ausgewertet bzw. diskutiert.

Fragestellung 1:

Besteht ein Unterschied in der PWV zwischen den Teilnehmer*innen der gesunden Kohorte, der Kohorte mit Atherosklerose und der Kohorte von Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 2?

Hypothese: Es besteht ein Unterschied in der PWV zwischen den drei untersuchten Kohorten. Die Pulswellengeschwindigkeit ist in der Kohorte 3 bei Patient*innen mit Atherosklerose am höchsten, am zweithöchsten in der Kohorte 2 bei Patient*innen mit T2DM und am niedrigsten in der Kohorte 1 bei den gesunden Personen.

Nullhypothese: Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die PWV zwischen allen 3 Gruppen.

Fragestellung 2:

Besteht ein Unterschied in der FMD zwischen den Teilnehmer*innen der gesunden Kohorte, der Kohorte mit Atherosklerose und der Kohorte von Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 2?

Hypothese: Es besteht ein Unterschied in der FMD zwischen den drei untersuchten Kohorten. Die FMD ist in der gesunden Kohorte am höchsten, am zweithöchsten in der Kohorte der Menschen mit Typ 2 Diabetes und am niedrigsten in der Kohorte der Patient*innen mit Atherosklerose.

Nullhypothese: Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die FMD zwischen allen 3 Gruppen.

Fragestellung 3:

Besteht ein Unterschied in der NMD zwischen den Teilnehmer*innen der gesunden Kohorte, der Kohorte mit Atherosklerose und der Kohorte von Menschen mit Diabetes Mellitus Typ 2?

Hypothese: Es besteht ein Unterschied in der NMD zwischen den drei untersuchten Kohorten. Die NMD ist in der gesunden Kohorte am höchsten, am zweithöchsten in der Kohorte der Menschen mit Typ 2 Diabetes und am niedrigsten in der Kohorte der Patient*innen mit Atherosklerose.

Nullhypothese: Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die NMD zwischen allen 3 Gruppen.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Insgesamt wurden 60 Personen in die Studie eingeschlossen. Die Studienpopulation gliedert sich dabei in 3 Kohorten zu je 20 Personen.

1. Kohorte: Gesunde Studienproband*innen (n=20)
2. Kohorte: Patient*innen mit Atherosklerose (n=20)
3. Kohorte: Patient*innen mit manifestem Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) (n=20)

Die Identifizierung und Rekrutierung der Personen, welche an der klinischen Studie teilnahmen, erfolgte über die Diabetesambulanz der Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie der Universitätsklinik Graz, mit Hilfe eines zentralen Registers für Studienproband*innen (Grazer Diabetesregister für Biomarker-Forschung - GIRO) sowie einem Unternehmen für Rekrutierungsleistungen (Probando;<https://www.probando.io>).

2.1.1 Einschlusskriterien Kohorte 1 (gesunde Personen)

- Alter > 18 Jahre
- Body Mass Index (BMI) zwischen 20.0 – 27.0 kg/m²

- Nüchternplasmaglukose oder Kapillarglukose < 110 mg/dl ohne Medikamente

2.1.2. Ausschlusskriterien Kohorte 1 (gesunde Personen)

- Vorgeschichte von kardiovaskulären Erkrankungen
- Vorliegen einer Stoffwechselerkrankung
- Einnahme von blutzuckersenkenden, lipidsenkenden oder blutdrucksenkenden Medikamenten
- Akute oder chronische entzündliche Erkrankung
- C2 Abusus (mehr als 15 Getränke/Woche)
- Bekannte maligne Tumorerkrankung
- Einnahme von illegalen Substanzen
- Schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die versuchen schwanger zu werden

2.1.3 Einschlusskriterien Kohorte 2 (Patient*innen mit T2DM)

- Alter > 18 Jahre
- T2DM unter diätischer Therapie oder einer Monotherapie oder Kombination von Metformin, DPP4-Hemmern, Sulfonylharnstoff oder SGLT2-Hemmern

2.1.4 Ausschlusskriterien Kohorte 2 (Patient*innen mit T2DM)

- Akute oder chronische entzündliche Erkrankung
- Vorgeschichte von Herz-Kreislauf-Erkrankungen
- C2 Abusus (mehr als 15 Getränke/Woche)
- Bekannte maligne Tumorerkrankung
- Einnahme von illegalen Substanzen
- Schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die versuchen schwanger zu werden

2.1.5 Einschlusskriterien Kohorte 3 (Patient*innen mit Atherosklerose)

- Alter > 18 Jahre

2.1.6 Ausschlusskriterien Kohorte 3 (Patient*innen mit Atherosklerose)

- Akutes kardiovaskuläres Ereignis innerhalb der letzten 3 Monate
- Etablierter T2DM
- Akute oder chronische entzündliche Erkrankung
- C2 Abusus (mehr als 15 Getränke/Woche)
- Bekannte maligne Tumorerkrankung
- Einnahme von illegalen Substanzen
- Schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die versuchen schwanger zu werden

2.2 Vorzeitige Beendigung der Studie

Jede/r Proband*in hatte das Recht, die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen oder Nachteile für die weitere medizinische Betreuung vorzeitig zu beenden. Prüfärzt*innen konnten die Teilnahme an der klinischen Studie vorzeitig beenden im Falle von: Vorhandensein signifikanter Protokollabweichungen, erheblicher Non-Compliance bei Untersuchungsverfahren, Widerruf der Studieneinwilligung, fehlender Verfügbarkeit von Nachbeobachtungen und jeder anderen Situation, in welcher die Teilnahme an der Studie nach Ansicht des Prüfarztes oder der Studienleitung als nicht sinnvoll erachtet wurde.

2.3 Studiendesign

Bei dieser Studie handelte es sich um eine prospektive Kohortenstudie. Das Ziel der Untersuchung war der Vergleich unterschiedlicher Messmethoden zur Messung der Endothelfunktion.

Diese klinische Studie wurde am Universitätsklinikum Graz an der Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie, an der Universitäts-Augenklinik sowie an der Abteilung für Angiologie durchgeführt. Es wurden insgesamt 60 Personen in die Studie eingeschlossen. Im Rahmen der Studie erfolgten zwei Studienvisiten im Umfang von circa zwei Stunden.

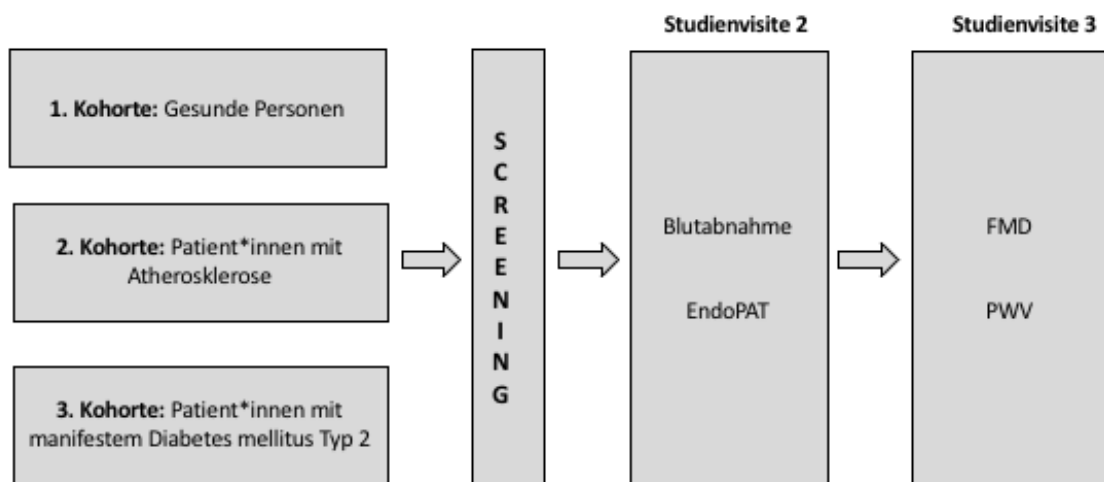


Abbildung 5: Studienablauf

	Visite 1 (Screeningvisite)	Visite 2 (9 ± 4 Tage nach der Visite 1)	Visite 3 (9 ± 4 Tage nach der Visite 2)
Einwilligungserklärung	X		
Überprüfung der Ein-/Ausschlusskriterien	X		
Erhebung demographischer Daten	X	X	X
Erhebung von Vorerkrankungen und dazugehöriger Medikation	X	X	X
Überprüfung der Vitalparameter	X	X	X
Körperliche Untersuchung	X		
EndoPAT-Messung		X	
FMD-Messung			X
PWV			X

Abbildung 6: Visitenübersicht

Visite 1

Im Rahmen der ersten Visite wurde der/die Proband*in ausführlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt und alle Fragen wurden mit dem Forschungsteam besprochen. Die Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie und das Einverständnis für die Biobank wurden von einem Prüfarzt eingeholt. Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden folgende Daten erhoben und Untersuchungen durchgeführt:

- Erhebung demographischer Daten (Geburtstag, Geschlecht etc.)
- Taille-Hüft-Verhältnis
- Erhebung der derzeitigen Erkrankungen und dazugehörige Medikation
- Messung der Vitalparameter: Ruhepuls und Blutdruck
- Blutabnahme und Harnprobe

Visite 2 (9 ± 4 Tage nach Visite 1)

Die zweite Studienvisite erfolgte 9 Tage (± 4 Tage) nach der ersten Visite. Die Patient*innen wurden angewiesen, morgens nüchtern zwischen 7:00 und 8:00 Uhr zur Visite am Studienzentrum der Abteilung für Diabetologie und Endokrinologie Billrothgasse 12 zu erscheinen. Im Rahmen der zweiten Studienvisite unterzogen sich die Patient*innen folgenden Verfahren:

- Erhebung der Vitalparameter, Gewicht
- Erhebung der vorhandenen Begleitmedikation
- Endothelfunktionsmessung mit EndoPAT 2000

Visite 3 (9 Tage ± 4 Tage nach Visite 2)

Die dritte Studienvisite erfolgte 9 Tage (± 4 Tage) nach der zweiten Visite. Die Patient*innen mussten nüchtern (für mindestens 8 Stunden vor der Visite durften kein Kaffee, Tabak, keine Vitamine oder Medikamente konsumiert werden) an die Abteilung für Angiologie des Universitätsklinikums Graz kommen. Bei der 2. Studienvisite wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Erhebung der Vitalparameter, Gewicht
- Vorhandene Begleitmedikation
- Messung der flussmedierten Vasodilatation (FMD)
- Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV)

2.4 Untersuchungsmethoden

2.4.1 Physikalische Untersuchung

Im Rahmen der ersten Studienvisite erfolgte eine physikalische Untersuchung unter Berücksichtigung folgender Punkte:

- Gesamterscheinung
- Kopf, Ohren, Augen, Nase, Hals, Nacken
- Herz-Kreislauf-System
- Atmungssystem
- Haut
- Schilddrüse
- Bewegungsapparat
- Peripheres Nervensystem

2.4.2 Erhebung der Vitalparameter

Die Messungen des systolischen und diastolischen Blutdrucks und der Pulsfrequenz wurden bei allen Studienvisiten durchgeführt. Der Blutdruck wurde in sitzender Position mit angelehntem Rücken und abgelegten Armen sowie nicht überkreuzten Beinen gemessen. Die Messung erfolgte nach einer 5-minütigen Ruhephase in sitzender Position. Während der Messung durfte nicht gesprochen werden.

2.4.3 Blutentnahme und Lagerung

Während der Studie wurden pro Proband*in insgesamt ca. 39 ml Blut entnommen, um die oben angeführten Parameter zu bestimmen. Reste von Serum und Plasma wurden pseudonymisiert bei -80°C in der Biobank der Medizinischen Universität Graz für eventuelle zukünftige Analysen aufbewahrt. Daher waren die Proband*innen gebeten worden, die Einverständniserklärung der Biobank zu unterschreiben.

2.4.4 FMD-Messung

Die flussmedierte Vasodilatation (FMD) der Arterie brachialis ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Beurteilung der Endothelfunktion/ Gefäßgesundheit. Mithilfe der FMD Messung wird die vasodilatatorische Antwort, welche auf der NO-Freisetzung aus dem Endothel basiert, nach einer reaktiven Hyperämie der A. brachialis gemessen.

Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Messung der FMD an der Abteilung für Angiologie des Universitätsklinikums Graz.

Zur Messung der FMD befindet sich der/die Patient*in in Rückenlage, mit dem Arm in einer bequemen Position. Nach einer 5-minütigen Ruhephase in einer liegenden Position wird eine Blutdruckmanschette unterhalb der Fossa antecubitalis am Unterarm angelegt und die Arteria brachialis in einer Längsebene zwischen 1-5 cm oberhalb der Fossa antecubitalis dargestellt. Es werden drei enddiastolische Durchmesser EKG-getriggert zwischen zwei Intimaschichten der A. brachialis in einem ein Zentimeter langen Abschnitt der A. brachialis gemessen.

Danach wird die Manschette 5 Minuten lang um mindestens 50 mmHg über dem systolischen Blutdruck aufgepumpt. Durch autoregulatorische Mechanismen kommt es zu einer Ischämie und in weiterer Folge einer Erweiterung der nachgeschalteten Widerstandsgefäße. Durch die anschließende Manschetten-Deflation wird eine reaktive Hyperämie verursacht. Der postischämische Durchmesser der A. brachialis wird kontinuierlich 30 Sekunden vor bis 2 Minuten nach dem Lösen der Manschette gemessen. Die FMD ist definiert als die Veränderung des postischämischen Durchmessers in Prozent des Ausgangsdurchmessers.

Nach einer Pause von 20 Minuten wird eine Nitroglycerin bezogene Dilatation (NDM) durchgeführt. Die NDM spiegelt die endothelunabhängige Vasodilatation, welche als Maß für die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur dient, wider. Der Durchmesser der Arteria brachialis wird ähnlich der für die FMD beschriebenen Technik vor und drei Minuten nach der sublingualen Verabreichung von 0,4 mg Nitroglycerinspray aufgezeichnet. Alle FMD- und NMD-Messungen werden mit

einem Linear-Array-Schallkopf mit 8-13MHz (Siemens ACUSON S2000TM, Siemens Healthcare Corp., Henkelstr., Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

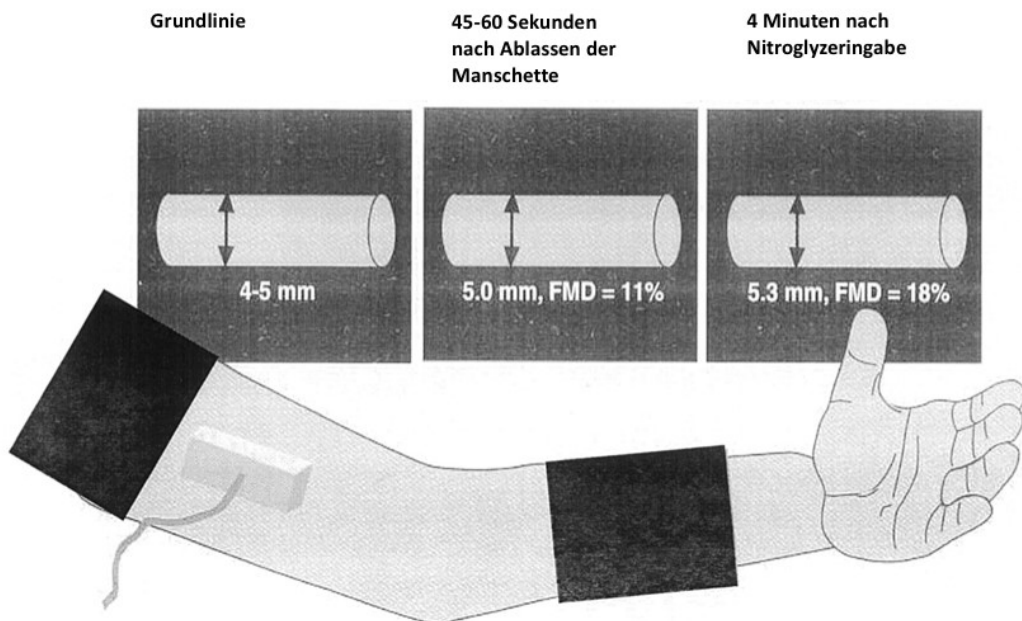


Abbildung 7: FMD Messung der A. brachialis (91)

$$\text{FMD} = \frac{\text{Hyperämie-Ausgangsdurchmesser}}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

$$\text{NMD} = \frac{\text{Nitro-Ausgangsdurchmesser}}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

Abbildung 8: Formeln zur Berechnung der FMD und NMD (92)

Aufgrund der Tatsache, dass die FMD-Messung von zahlreichen Faktoren abhängig ist, müssen strenge Richtlinien betreffend der Methodik und Technik bei der Messung beachtet werden (91).

2.4.5 Endo-PAT

Die periphere arterielle Tonometrie mittels EndoPAT 2000 ist eine zuverlässige nicht-invasive Methode zur Beurteilung der Gefäßfunktion (93, 94).

Die speziell entwickelten Sonden mit aufblasbaren Latex-Luftmanschetten, die durch pneumatische Schläuche mit einer durch den Computer gesteuerten Aufblasvorrichtung verbunden sind, werden auf den Mittelfingern der Hände positioniert. An den Sonden wird ein konstanter Gegendruck durch die Luftkissen aufgebaut. Die pulsierenden Volumenänderungen des distalen Fingers werden mithilfe eines Druckwandlers erfasst und an das EndoPAT 2000-Gerät übermittelt und aufgezeichnet. Durch Abnahme des arteriellen Blutvolumens in den distalen Fingerspitzen kommt es zu einer Abnahme des gemessenen PAT-Signals.

Vor der Messung des reaktiven Hyperämie-Index befinden sich die Proband*innen für mindestens 10 Minuten in Rückenlage, in einem ruhigen, temperierten Raum mit gedimmtem Licht. Die Sonden werden an beiden Zeigefingern angebracht und die Pulswellenamplituden werden erfasst und aufgezeichnet. Nach einer fünfminütigen Basismessung wird der arterielle Fluss mittels einer Blutdruckmanschette am nicht dominanten Arm unterdrückt. Die Manschette wird dabei auf 60 mmHg oder zumindest 200 mmHg über dem systolischen Druck aufgepumpt. Nach der fünfminütigen Okklusion wird die Manschette schnell entleert, um eine reaktive Hyperämie zu ermöglichen. Die Pulswellenamplituden werden erneut für mindestens fünf Minuten nach Deflation der Manschette aufgezeichnet. Der reaktive Hyperämieindex (RHI) ist das Verhältnis des peripheren arteriellen Tonus PAT-Signals nach der Manschettenfreigabe im Vergleich zum Ausgangswert. Dieser wird durch einen Computeralgorithmus berechnet, der sich automatisch auf das Ausgangssignal normalisiert und auf den kontralateralen Arm indexiert. Es gibt keine offiziellen Normwerte für den RHI, jedoch wird bei einem RHI-Wert <2 von einer endothelialen Dysfunktion gesprochen, während RHI-Werte >2 als normal gelten. (95)

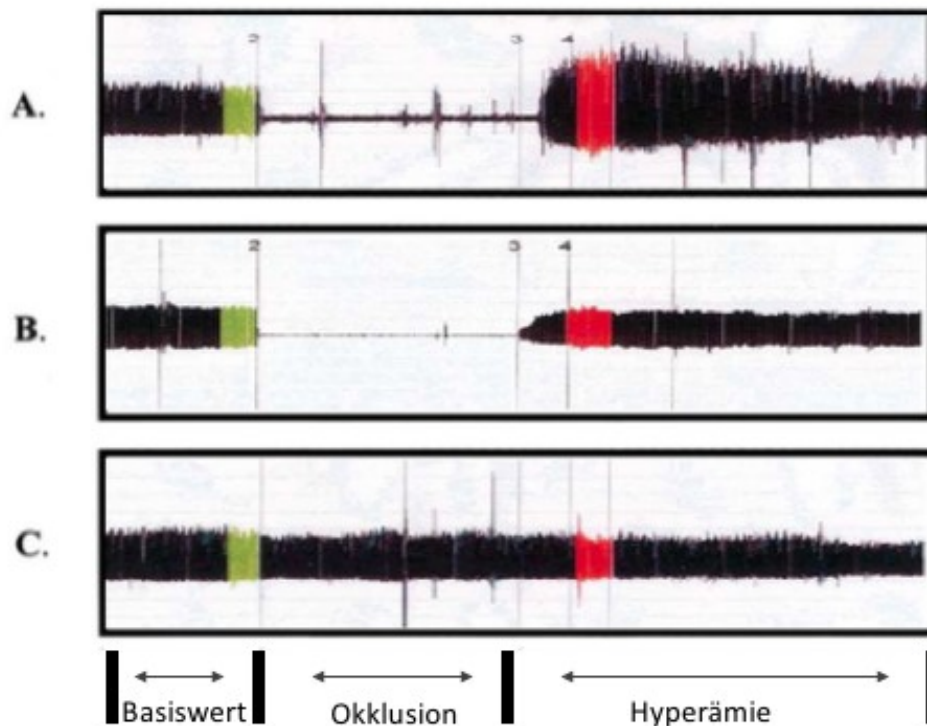


Abbildung 9: PAT-Signal (93)

Die Abbildung zeigt den Vergleich des PAT-Signals beim Gesunden und bei Patient*innen mit kardiovaskulärer Erkrankung: Grundlinie, während Okklusion mit Blutdruckmanschette und während reaktiver Hyperämie beim Gesunden (A) und Patient*innen mit kardiovaskulärer Erkrankung (B,C)(93).

- 1) Gesunde Personen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren zeigen zu Beginn des Tests ein beständiges PAT-Signal. Nach Okklusion der Manschette verschwindet dieses Signal. Bei Manschettenöffnung kommt es zu einer Zunahme des PAT-Signals als Zeichen der reaktiven Hyperämie.
- 2) Patient*innen mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen keine ausgeprägte Zunahme des PAT-Signals im Vergleich zu gesunden Personen in der Phase der reaktiven Hyperämie.
- 3) Kontrolle des kontralateralen Fingers bei Patient*innen mit kardiovaskulärer Erkrankung

Des Weiteren wurde mit dem EndoPAT 2000 der Augmentationsindex als Maß für die Gefäßsteifigkeit ermittelt. Je höher der Augmentationsindex ist, desto steifer ist das Gefäß.

2.4.6 Pulswellengeschwindigkeit

Die Pulswellenanalyse, einschließlich Aorten-PWV, Augmentationsindex und Pulsdruck, wurde gemessen und über das oszillometrische Gerät Mobil-O-Graph® (I.E.M., Aachen, Deutschland) durch automatisierte Analyse berechnet. Nach einer Ruhezeit von 5 Minuten wurde eine größenangepasste Manschette am rechten Oberarm etwa 2-4 Zentimeter oberhalb der Ellenbeuge in Rückenlage angelegt und anschließend eine Pulswellenanalyse durchgeführt. Die Patient*innen wurden aufgefordert, nicht zu sprechen.

Laut der aktuellen ESH/ESC Guidelines gelten PWV-Werte > 10 m/s als pathologisch(96).

2.5 Statistische Analyse

Die Parameter wurden anhand des Kolmogorov-Smirnov Anpassungstests auf Normalverteilung getestet. Der Gruppenvergleich von normalverteilten Parametern wurde anhand eines T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Bei nicht-normalverteilten Stichproben wurde zum Vergleich aller Gruppen der Kruskal Wallis-Test eingesetzt. Die Vergleiche von 2 Gruppen untereinander wurden anhand des Mann Whitney U Tests berechnet. Ein P-Wert $< 0,05$ galt als statistisch signifikant. Die statistische Analyse wurde in SPSS (Version 23, IBM Corp., Armonk, New York) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (\pm Standardabweichung) bei Normalverteilung der Daten und als Median (Interquartilsrange) bei nicht-normalverteilten Daten dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Baseline Charakteristika der Studienkohorten

Tabelle 5: Baseline Charakteristika

Charakteristik*	Kohorte 1 Gesunde Personen (n = 20)	Kohorte 2 Patient*innen mit T2DM (n = 20)	Kohorte 3 Patient*innen mit Atherosklerose (n = 20)	p-Wert
Alter, Jahre	32 ± 9	63 ± 7	59 ± 7	<0,001
Geschlecht, weiblich	13 (65%)	13 (65%)	8 (40%)	0,183
Blutdruck systolisch, mmHg	119 ± 15	129 ± 15	141 ± 17	<0,001
Blutdruck diastolisch, mmHg	77 ± 10	84 ± 9	93 ± 11	<0,001
Körpergröße, cm	170 ± 9	170 ± 8	171 ± 10	0,975
Körpergewicht, kg	67 ± 12	87 ± 16	84 ± 18	<0,001
BMI, kg/m²	23,1 ± 2,9	30,0 ± 5,0	28,6 ± 4,3	<0,001

*Mittelwert ± Standardabweichung für metrische Variablen und n (%) für kategoriale Variablen
 BMI, Body Mass Index; KHK, koronare Herzkrankheit; pAVK, periphere arterielle Verschlusskrankheit; zAVK, zentrale arterielle Verschlusskrankheit; T2DM, Typ 2 Diabetes Mellitus

Tabelle 5 listet die Baseline Charakteristika der 3 untersuchten Kohorten auf. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Alter zwischen den Gruppen. Im Vergleich zu Kohorte 2 und 3 waren die Teilnehmer*innen der Kohorte 1 mit einem Durchschnittsalter von 32 ± 9 Jahren wesentlich jünger. Die Geschlechterverteilung in den Gruppen gestaltete sich in Kohorte 1 und 2 gleich, wohingegen in Kohorte 3 weniger Frauen als in den anderen beiden Kohorten an der Studie teilnahmen 8 (40%). Sowohl der systolische Blutdruck als auch der diastolische Blutdruck unterschieden sich zwischen den Gruppen statistisch signifikant. Die Patient*innen der Kohorte 3 wiesen im Durchschnitt die höchsten systolischen und diastolischen Blutdruckwerte zu Baseline auf, während die Blutdruckwerte in der gesunden Kohorte 1 am niedrigsten waren. Es zeigten sich in allen Kohorten keine signifikanten Unterschiede bei der Körpergröße. In Bezug auf Körpergewicht und BMI wiesen die Kohorten jedoch signifikante Unterschiede auf. In der Kohorte der Patient*innen mit Typ2DM zeigte sich sowohl das höchste

Körpergewicht als auch der höchste BMI im Vergleich zu den anderen beiden Kohorten.

3.2 Vorerkrankungen und Begleitmedikation

Tabelle 6: Vorerkrankungen

Vorerkrankungen*	Kohorte 1 Gesunde Personen (n = 20)	Kohorte 2 Patient*innen mit T2DM (n =20)	Kohorte 3 Patient*innen mit Atherosklerose (n = 20)
Atherosklerose	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)
KHK	0 (0%)	0 (0%)	18 (90%)
pAVK	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
zAVK	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
T2DM	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)
Hyperlipidämie	0 (0%)	14 (70%)	10 (50%)
arterielle Hypertonie	0 (0%)	17 (90%)	15 (75%)
Myokardinfarkt	0 (0%)	0 (0%)	14 (70%)

*Vorerkrankungen in absoluten Zahlen und relativen Zahlen (%)

Während in der Kohorte 1 keine Begleiterkrankungen dokumentiert wurden, waren in der Gruppe der Patient*innen mit T2DM bei 90% der Personen eine begleitende arterielle Hypertonie sowie bei 14 Personen eine Hyperlipidämie prävalent. 18 Personen der Kohorte mit atherosklerotischen Erkrankungen wiesen eine diagnostizierte KHK auf und jeweils 1 Patient*in pAVK sowie zAVK. Zusätzlich zeigten 10 Patient*innen dieser Kohorte eine begleitende Hyperlipidämie, 15 eine arterielle Hypertonie sowie 14 Personen ein akutes Ereignis in der Vergangenheit in Form eines Myokardinfarktes.

Tabelle 7: Medikation

Medikation*	Kohorte 1 Gesunde Personen (n = 20)	Kohorte 2 Patient*innen mit T2DM (n = 20)	Kohorte 3 Patient*innen mit Atherosklerose (n = 20)
Antihypertensiva	0 (0%)	14 (70%)	14 (70%)
Lipidsenker	0 (0%)	11 (55%)	15 (75%)
Betablocker	0 (0%)	5 (25%)	13 (65%)
Thrombozytenaggregationshemmer	0 (0%)	4 (20%)	14 (70%)
Insulintherapie	0 (0%)	11 (55%)	0 (0%)
Antidiabetika	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)
Antikoagulation	0 (0%)	1 (5%)	2 (10%)

**Medikation in absoluten Zahlen und relativen Zahlen (%)*

Die gesunden Personen der Kohorte 1 waren von keiner Dauermedikation betroffen. In der Kohorte 2 standen mehr als die Hälfte der Proband*innen in einer Therapie mit einem Antihypertensivum, einem Lipidsenker oder einem Antidiabetikum. 5 Proband*innen der Kohorte 2 nahmen einen Betablocker ein, 4 Personen einen Thrombozytenaggregationshemmer und nur eine Person hatte eine antikoagulative Therapie. In Kohorte 3 nahmen mehr als die Hälfte der Patient*innen einen Lipidsenker ein. Je 14 Personen in Kohorte 3 hatten ein Antihypertensivum und eine medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung als Dauermedikation. Nur 2 Personen in Kohorte 3 hatten eine Antikoagulation und eine Person in der Kohorte mit Atherosklerose hatte eine antidiabetische Therapie.

3.3 Pulswellenanalyse

Tabelle 8: Pulswellenanalyse

Parameter*	Kohorte 1 Gesunde (n = 20)	Kohorte 2 T2DM (n = 20)	Kohorte 3 AS (n = 20)	P-Wert*	p-Wert ¹	p-Wert ²	p-Wert ³
PWV, m/s	5,4 ± 0,7	9,0 ± 1,3	8,9 ± 1,2	<0,001	<0,001	0,734	<0,001
PPAmp	1,30 (1,18–1,40)	1,40 (1,30–1,40)	1,30 (1,20 – 1,45)	0,056	0,020	0,121	0,613
SV, ml	76,1 (66,9–89,6)	69,9 (65,2–78,1)	72,5 (69,1–83,6)	0,245	0,126	0,208	0,732
HMV, l/min	4,5 (4,1–5,3)	4,7 (4,3–5,2)	4,4 (4,3–4,8)	0,603	0,480	0,346	0,807
TPR, s*mmHg/ml	1,3 (1,1–1,4)	1,3 (1,2–1,4)	1,5 (1,4–1,7)	0,001	0,599	0,001	0,002
HI, l/min*1/m ²	2,6 (2,3 – 3,0)	2,4 (2,1–2,6)	2,3 (2,2–2,5)	0,033	0,057	0,471	0,014
AugP, mmHg	9,6 ± 7,4	10,0 ± 10,0	14,5 ± 7,2	0,470	0,918	0,380	0,199
RC, %	65,7 ± 8,3	65,4 ± 6,7	66,8 ± 7,2	0,830	0,886	0,532	0,677
Alx75 [90%CI], %	16,6 ± 12,6	23,6 ± 13,7	29,8 ± 11,6	0,013	0,112	0,158	0,003

*Vergleich von allen 3 Kohorten; ¹ Vergleich Kohorte 1 und 2; ² Vergleich Kohorte 2 und 3; ³ Vergleich Kohorte 1 und 3; Mittelwert ± Standardabweichung für normalverteilte Variablen, Median (Interquartilsrange) für nicht-normalverteilte Variablen; T2DM, Typ 2 Diabetes Mellitus; AS, Atherosklerose, PWV, Pulswellengeschwindigkeit; PPAmp, Pulsdruckamplifikation; SV, Schlagvolumen; HMV, Herzminutenvolumen; TPR, peripherer Widerstand; HI, Herzindex; AugP, Augmentationsdruck; RC, Reflexionskoeffizienz; Alx75, Augmentationsindex@75

Es zeigten sich signifikante Unterschiede der Pulswellengeschwindigkeit, des peripheren Widerstandes, des Herzindex und des Augmentationsindex@75 im Vergleich aller Kohorten. Alle übrigen Parameter (Schlagvolumen, Herzminutenvolumen, Augmentationsdruck sowie Reflexionskoeffizient) erwiesen sich im Vergleich aller Kohorten als statistisch nicht signifikant

3.3.1 Pulswellengeschwindigkeit

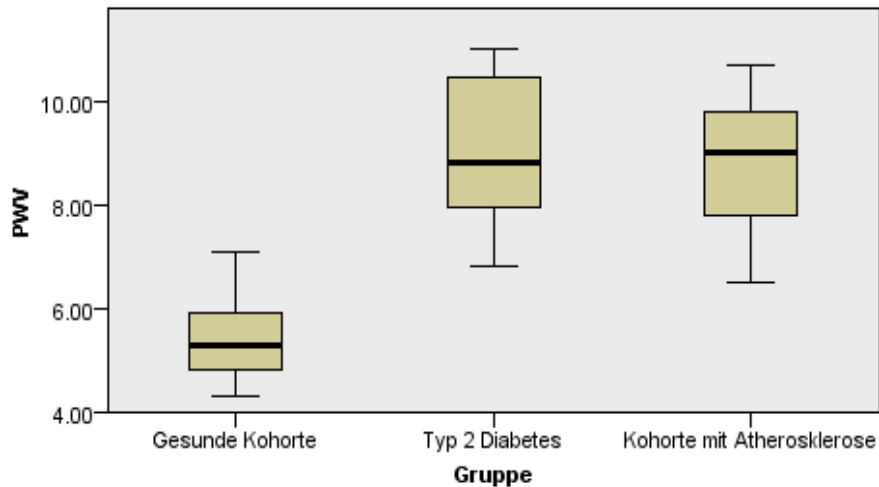


Abbildung 10: Pulswellengeschwindigkeit

Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) in der PWV sowohl im Vergleich aller untersuchten Kohorten als auch im Vergleich zwischen der gesunden Kohorte mit der Kohorte 2 ($p < 0,001$) und Kohorte 3 ($p < 0,001$). Der Unterschied der PWV zwischen der Kohorte mit T2DM und der Kohorte mit Atherosklerose war nicht signifikant. Die PWV war in der Kohorte mit T2DM ($9,0 \pm 1,3$ m/s) am höchsten und in der gesunden Kohorte am niedrigsten ($5,4 \pm 0,7$ m/s). In der Kohorte mit Atherosklerose betrug die PWV $8,9 \pm 1,2$ m/s.

3.3.2 Pulsdruckamplifikation

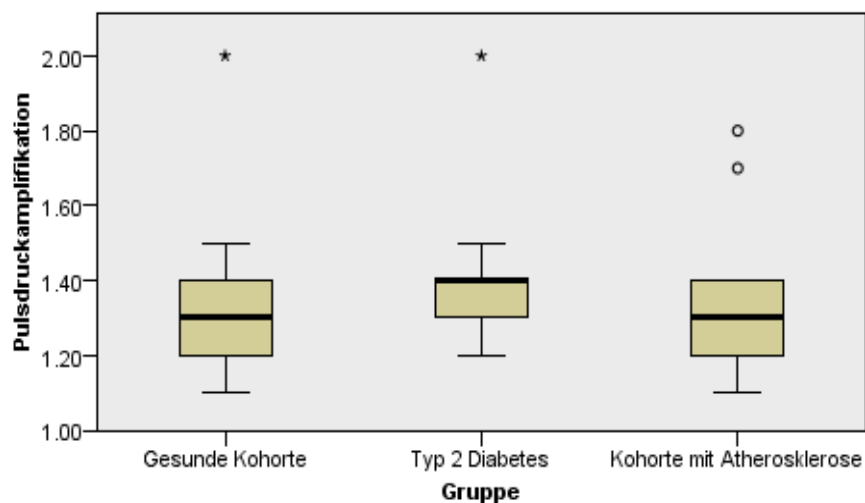


Abbildung 11: Pulsdruckamplifikation

Die Pulsdruckamplifikation erwies sich im Vergleich aller Kohorten als statistisch nicht signifikant ($p=0,056$). Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte mit T2DM und der gesunden Kohorte. Der Median der Pulsdruckamplifikation war am höchsten in der Kohorte mit T2DM 1,40 (1,30–1,40), wobei der Median der Pulsdruckamplifikation der gesunden Kohorte und der Kohorte mit Atherosklerose gleich war.

3.3.3 Schlagvolumen

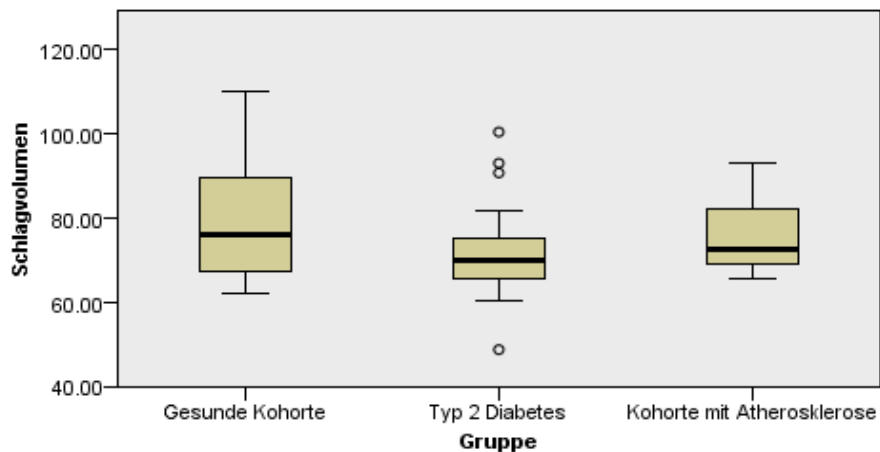


Abbildung 12: Schlagvolumen

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des Schlagvolumens zwischen allen Kohorten. Auch im Vergleich einer Kohorte mit einer anderen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

3.3.4 Herzminutenvolumen



Abbildung 13: Herzminutenvolumen

Das HZV ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich aller Kohorten oder im Vergleich zwischen den einzelnen Kohorten.

3.3.5 Totaler peripherer Widerstand



Abbildung 14: peripherer Widerstand

Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede des TPR im Vergleich aller Kohorten ($p=0,001$). Auch im Vergleich der Kohorte 2 mit der Kohorte 3 ($p=0,001$) sowie zwischen der Kohorte 3 und der gesunden Kohorte ($p=0,002$) waren die Unterschiede statistisch signifikant. Der Median des TPR war in der Kohorte 3 mit 1,5 (1,4 – 1,7) am höchsten. Der Median des TPR war in der gesunden Kohorte gleich wie in der Kohorte mit T2DM.

3.3.6 Herzindex

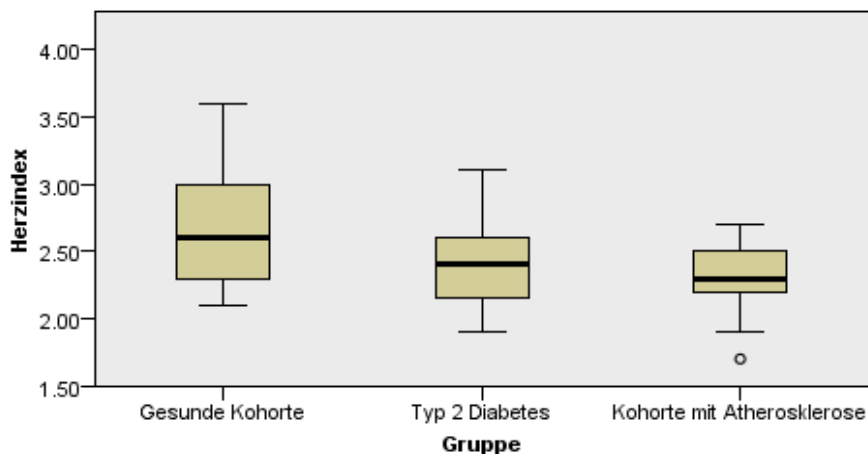


Abbildung 15: Herzindex

Auch in Bezug auf den HI ergab sich sowohl im Vergleich allen Kohorten ($p=0,033$) als auch zwischen der gesunden Kohorte und der Kohorte mit Atherosklerose ($p=0,014$) ein signifikanter Unterschied. Der Median des HI betrug in der Kohorte 3 bei Patient*innen mit Atherosklerose 2,3 (2,2 – 2,5) und in Kohorte 2 bei Patient*innen mit T2DM 2,4 (2,1 – 2,6). Den höchsten Median in Bezug auf den HI wiesen die gesunden Personen der Kohorte 1 mit 2,6 (2,3 – 3,0) auf.

3.3.7 Augmentationsdruck

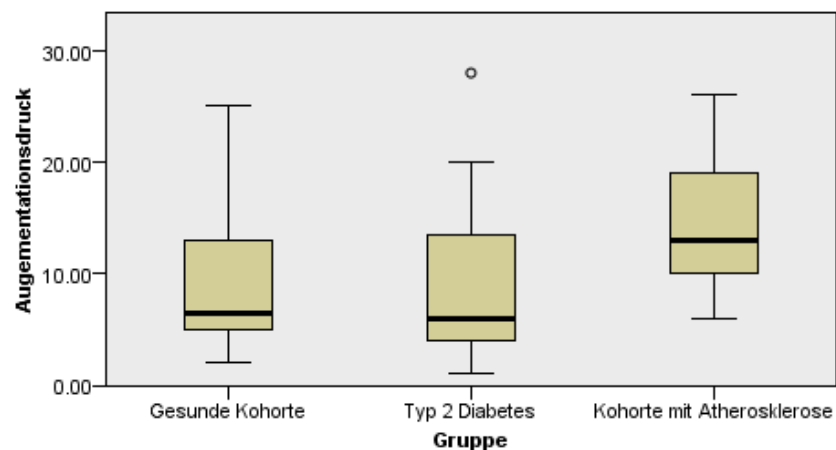


Abbildung 16: Augmentationsdruck

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Augmentationsdrucks im Vergleich aller Kohorten oder im Vergleich einer einzelnen Kohorte mit einer anderen.

3.3.8 Reflexionskoeffizient

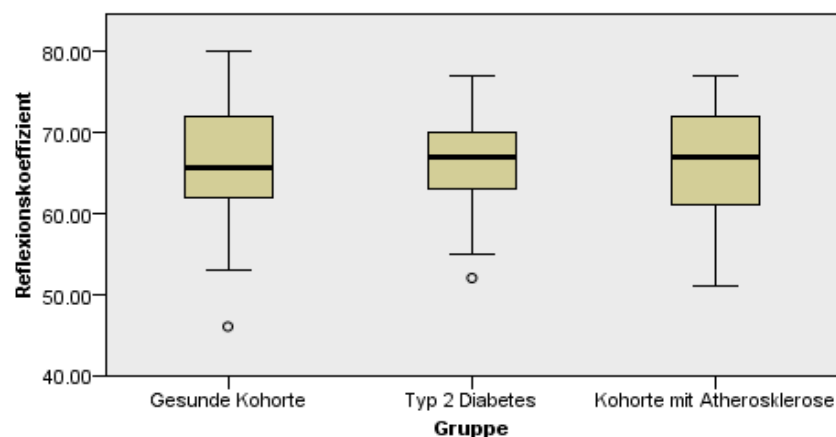


Abbildung 17: Reflexionskoeffizient

Auch der Reflexionskoeffizient wies keinen signifikanten Unterschied im Vergleich aller Kohorten oder einer einzelnen Kohorte mit einer anderen auf.

3.3.9 Augmentationsindex

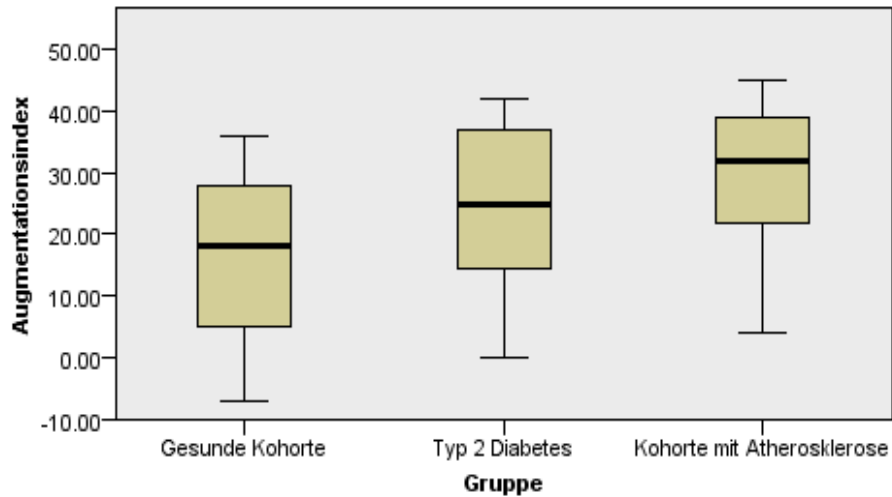


Abbildung 18: Augmentationsindex

Der Alx ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich aller Kohorten ($p=0,013$) und im Vergleich der gesunden Kohorte mit der Kohorte 3 ($p=0,003$). Der durchschnittliche Alx war in der Kohorte 3 ($29,8 \pm 11,6\%$) am höchsten und in der Kohorte 1 mit gesunden Personen am niedrigsten ($16,6 \pm 12,6\%$).

3.4 Flussvermittelte Vasodilatation

Tabelle 9: flussvermittelte Vasodilatation

Parameter*	Kohorte 1 Gesunde Personen (n = 20)	Kohorte 2 Patient*innen mit T2DM (n = 20)	Kohorte 3 Patient*innen mit Atherosklerose (n = 20)	P- Wert*	p- Wert ¹	p- Wert ²	p- Wert ³
FMD, %	6,5 ± 4,1	2,0 ± 4,8	4,5 ± 3,6	0,006	0,003	0,074	0,117
NMD, %	19,1 ± 6,3	15,2 ± 4,5	15,7 ± 5,1	0,098	0,052	0,721	0,102

*Vergleich aller 3 Kohorten; ¹ Vergleich Kohorte 1 und 2; ² Vergleich Kohorte 2 und 3; ³ Vergleich Kohorte 1 und 3; Mittelwert ± Standardabweichung für normalverteilte Variablen; FMD, flussvermittelte Dilatation; NMD, endothelunabhängige Vasodilatation

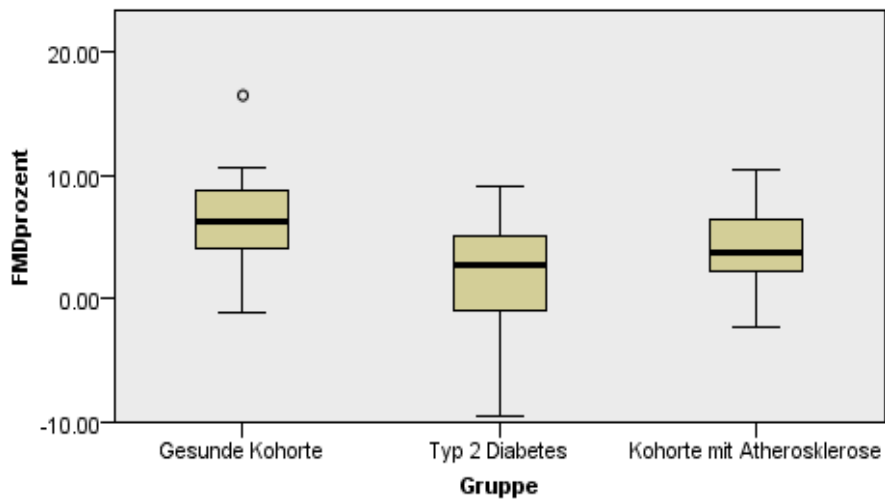


Abbildung 19: FMD (%)

Im Vergleich aller Kohorten zeigte sich ein signifikanter Unterschied der FMD ($p=0,006$). Auch der Unterschied zwischen der gesunden Kohorte und der Kohorte mit T2DM war statistisch signifikant ($p=0,006$). Die durchschnittliche FMD war in der Kohorte mit gesunden Personen am höchsten ($6,5 \pm 4,1\%$). Die niedrigste durchschnittliche FMD ($2,0 \pm 4,8\%$) wurde in der Kohorte mit T2DM gemessen. In der Kohorte 3 betrug die FMD im Mittel $4,5 \pm 3,6\%$.

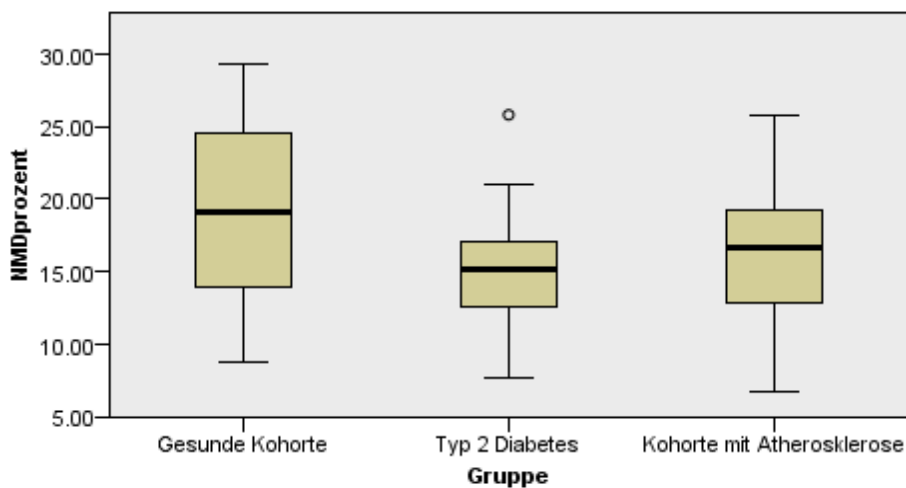


Abbildung 20: NMD (%)

Die NMD zeigte weder im Vergleich aller Kohorten noch im Vergleich einer einzelnen Kohorte mit einer anderen einen statistisch signifikanten Unterschied.

4. Diskussion

Die Endotheldysfunktion ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose und geht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher (2, 41). Die Wissenschaft beschäftigt sich schon seit Jahrzehnten damit, einen geeigneten Prädiktor zur Früherkennung von Atherosklerose und zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos zu finden. Ein vielversprechender Ansatz ist die Messung der Endothelfunktion. Es existieren zahlreiche invasive als auch nicht invasive Methoden zur Messung der Endothelfunktion und Beurteilung der Gefäßsteifigkeit (97). Die Evidenz über die Übereinstimmung der einzelnen Messmethoden und, ob diese vergleichbare Resultate liefern, hält sich aber noch in Grenzen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den direkten Vergleich nicht invasiver Methoden zur Messung der Endothelfunktion in einer gesunden Kohorte, einer Kohorte mit Atherosklerose und einer Kohorte von Menschen mit T2DM herzustellen sowie diese Gruppen und die Ergebniswerte in diesen drei Gruppen miteinander zu vergleichen.

Die PWV ist eine häufig genutzte Methode zur Messung der Gefäßsteifigkeit und weist eine gute Korrelation mit dem Risiko für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf. Durch atherosklerotische Veränderungen der Gefäße kommt es zum Verlust der elastischen Gefäßfunktion und zum fibrotischen Umbau der Arterienwände. Diese Pathomechanismen haben eine Gefäßversteifung zur Folge (98). In Arterien mit hoher Gefäßsteifigkeit ist die PWV erhöht (99).

In dieser Studie zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der PWV, sowohl im Vergleich aller untersuchten Kohorten als auch im Vergleich zwischen der gesunden Kohorte mit der Kohorte 2 ($p < 0,001$) und Kohorte 3 ($p < 0,001$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der PWV zwischen der Kohorte mit T2DM und der Kohorte der Patient*innen mit Atherosklerose. Die PWV war in der T2DM Kohorte am höchsten ($9,0 \pm 1,3$ m/s), am zweithöchsten in der Atherosklerose-Kohorte ($8,9 \pm 1,2$ m/s) und am niedrigsten bei den gesunden Personen ($5,4 \pm 0,7$ m/s). Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl Patient*innen mit T2DM als auch Patient*innen mit Atherosklerose eine erhöhte Gefäßsteifigkeit aufweisen. Auch

weitere Studien konnten die Korrelation der Gefäßsteifigkeit bei Patient*innen mit T2DM und Atherosklerose verifizieren (100, 101).

Auch in Bezug auf die FMD zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich aller Kohorten ($p=0,006$). Zwischen der gesunden Kohorte und der Kohorte mit T2DM zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,006$). Der Vergleich von Kohorte 1 und Kohorte 3 lieferte jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis. Die FMD war in der gesunden Kohorte am höchsten, am zweithöchsten in der Kohorte 3 (Patient*innen mit Atherosklerose) und am niedrigsten in der Kohorte mit Typ 2 Diabetiker*innen. Entgegen unserer Annahme, dass Patient*innen mit Atherosklerose die niedrigste FMD aufweisen, wurde in unserer Studie der niedrigste FMD-Wert in der Kohorte der Patient*innen mit T2DM gemessen. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Patient*innen mit T2DM in unserer Studie häufiger an Begleiterkrankungen, wie Hyperlipidämie und arterieller Hypertonie litten als in der Kohorte mit Atherosklerose. Sowohl die Hyperlipidämie als auch die arterielle Hypertonie gelten als relevante Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen (102). Zudem wurde bei der Rekrutierung der Patient*innen nur nach den bisherigen Diagnosen in der Krankengeschichte selektiert. Es könnte daher sein, dass Patient*innen mit T2DM ebenfalls bereits an Atherosklerose litten, diese jedoch noch nicht diagnostiziert worden war.

Im Vergleich zur FMD ergab die Messung der NMD, welche der Unterscheidung der endothelabhängigen von der endothelunabhängigen Vasodilatation dient (91), keine signifikanten Unterschiede in den Kohorten. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass sowohl die FMD als auch die NMD bei Patient*innen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und KHK beeinträchtigt sind (103, 104).

Zur beachten ist, dass sowohl die Messung der FMD als auch der NMD untersucherabhängig ist und viel Erfahrung in der Durchführung bedarf. Somit kann die Messung von Untersucher zu Untersucher unterschiedliche Resultate liefern. Eine Standardisierung der Messung ist schwierig und ist mitunter ein Grund, dass die FMD noch keine breite Anwendung in der Klinik findet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die FMD Messung zur Beurteilung der Endothelfunktion eine gute Einschätzung für den Zustand der Gefäße liefert, es jedoch einer Weiterentwicklung in Bezug auf die Durchführung der Messungen sowie einer Standardisierung der einzelnen Methoden bedarf, um die Ergebnisse in unterschiedlichen Kohorten besser vergleichen zu können.

5. Literaturverzeichnis

1. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangre D, Creager MA, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1995;75(6):71b-4b.
2. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(3):183-98.
3. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology.* 1995;26(5):1235-41.
4. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(11):2137-41.
5. Jadhav UM, Kadam NN. Non-invasive assessment of arterial stiffness by pulse-wave velocity correlates with endothelial dysfunction. *Indian Heart J.* 2005;57(3):226-32.
6. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 1987;18(3):234-9.
7. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302-12.
8. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6.
9. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6.
10. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333(6174):664-6.
11. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo J-p, Lefer AM. Nitric Oxide Protects Against Leukocyte-Endothelium Interactions in the Early Stages of Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1995;15(10):1652-9.
12. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651-5.
13. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 1994;267(5 Pt 1):C1405-13.

14. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*. 1992;85(6):2284-90.
15. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(3):631-8.
16. Lerman A, Burnett JC, Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992;86(6 Suppl):Iii12-9.
17. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
18. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
19. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. 2004;109(21):2617-25.
20. GIMBRONE JR. MA, TOPPER JN, NAGEL T, ANDERSON KR, GARCIA-CARDEÑA G. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;902(1):230-40.
21. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:436-41.
22. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*. 1997;80(9a):11i-6i.
23. National Heart, Lung, and Blood Institute. Working Group on Arteriosclerosis. (1981). *Arteriosclerosis 1981 : report of the Working Group on Arteriosclerosis of the National Heart, Lung and Blood Institute*. [United States] : U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health
24. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021.
25. Rector TS, Anand IS, Cohn JN. Relationships between clinical assessments and patients' perceptions of the effects of heart failure on their quality of life. *J Card Fail*. 2006;12(2):87-92.
26. Zambroski CH, Moser DK, Bhat G, Ziegler C. Impact of symptom prevalence and symptom burden on quality of life in patients with heart failure. *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2005;4(3):198-206.

27. Ohsfeldt RL, Gandhi SK, Fox KM, Bullano MF, Davidson M. Medical and cost burden of atherosclerosis among patients treated in routine clinical practice. *J Med Econ.* 2010;13(3):500-7.
28. Frohlich J, Al-Sarraf A. Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):16-8.
29. Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views.* 2017;18(3):109-14.
30. Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circulation Journal.* 2009;73(4):595-601.
31. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323(1):22-7.
32. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990;81(2):491-7.
33. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2548-54.
34. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993;88(5 Pt 1):2149-55.
35. Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(3):180-96.
36. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2(Suppl 2):S314-21.
37. Monnink SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, et al. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med.* 2002;50(1):19-24.
38. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation.* 2002;106(24):3073-8.

39. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart*. 2000;83(2):205-9.
40. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology*. 2000;130(5):963-74.
41. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*. 2000;87(10):840-4.
42. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983-92.
43. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
44. Renz-Poster, H., Krautzig, S. (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin. kompakt-greifbar-verständlich*. 4. Auflage. München: Urban&Fischer, 2008. S. 63.
45. Silbernagl S, Lang, F: *Taschenatlas Pathophysiologie*. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2009. S. 232.
46. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO, 3rd. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation*. 1995;92(3):320-6.
47. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101(9):948-54.
48. Motz W, Vogt M, Rabenau O, Scheler S, Lückhoff A, Strauer BE. Evidence of endothelial dysfunction in coronary resistance vessels in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *Am J Cardiol*. 1991;68(10):996-1003.
49. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106(6):653-8.
50. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep*. 2019;21(4):21.
51. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*. 1979;59(1):8-13.

52. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes*. 1974;23(2):105-11.
53. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*. 2000;321(7258):405-12.
54. Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Sarada DV, Ramkumar KM. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. *Br J Nutr*. 2016;116(2):223-46.
55. Hogikyan RV, Galecki AT, Pitt B, Halter JB, Greene DA, Supiano MA. Specific impairment of endothelium-dependent vasodilation in subjects with type 2 diabetes independent of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):1946-52.
56. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(8):771-6.
57. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510-6.
58. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA*. 2002;287(19):2570-81.
59. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):963-74.
60. Hennes MMI, O'Shaughnessy IM, Kelly TM, LaBelle P, Egan BM, Kissebah AH. Insulin-Resistant Lipolysis in Abdominally Obese Hypertensive Individuals. *Hypertension*. 1996;28(1):120-6.
61. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939-45.
62. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2007;28(19):2375-414.

63. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2010;122(25):2748-64.
64. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(10):1769-75.
65. Rossi R, Nuzzo A, Origliani G, Modena MG. Prognostic role of flow-mediated dilation and cardiac risk factors in post-menopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(10):997-1002.
66. Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki J-i, Nagai R. Diagnosis and Treatment of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease
A Review. *International Heart Journal*. 2010;51(1):1-6.
67. Agewall S, Doughty RN, Bagg W, Whalley GA, Braatvedt G, Sharpe N. Comparison of ultrasound assessment of flow-mediated dilatation in the radial and brachial artery with upper and forearm cuff positions. *Clin Physiol*. 2001;21(1):9-14.
68. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315(17):1046-51.
69. Yasue H, Matsuyama K, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1990;81(2):482-90.
70. Higashi Y, Yoshizumi M. New methods to evaluate endothelial function: method for assessing endothelial function in humans using a strain-gauge plethysmography: nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. *J Pharmacol Sci*. 2003;93(4):399-404.
71. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(5):1235-41.
72. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.

73. Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Evaluating endothelial function in humans: a guide to invasive and non-invasive techniques. *Heart*. 2005;91(4):553-8.
74. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-67.
75. Pereira T, Correia C, Cardoso J. Novel Methods for Pulse Wave Velocity Measurement. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2015;35(5):555-65.
76. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of Rapid Onset Vascular Endothelial Dysfunction After Hyperhomocysteinemia. *Circulation*. 1999;99(9):1156-60.
77. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RMA, Deanfield JE. Endothelium-Dependent Dilatation Is Impaired in Young Healthy Subjects With a Family History of Premature Coronary Disease. *Circulation*. 1997;96(10):3378-83.
78. Iiyama K, Nagano M, Yo Y, Nagano N, Kamide K, Higaki J, et al. Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J*. 1996;132(4):779-82.
79. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res*. 1997;34(1):164-8.
80. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010;26(6):631-40.
81. Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp*. 2010(44).
82. Flammer AJ, Lüscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):1005-13.
83. Bortolotto LA, Safar ME, Billaud E, Lacroix C, Asmar R, London GM, et al. Plasma Homocysteine, Aortic Stiffness, and Renal Function in Hypertensive Patients. *Hypertension*. 1999;34(4):837-42.
84. Wilmer, C. V., Nichols, W., & O'Rourke, M. F. (2005). McDonald's blood flow in arteries—Theoretical, experimental and clinical principles. CRC Press: London.
85. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the

Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159-219.

86. Ong ME, Lee Ng CH, Goh K, Liu N, Koh ZX, Shahidah N, et al. Prediction of cardiac arrest in critically ill patients presenting to the emergency department using a machine learning score incorporating heart rate variability compared with the modified early warning score. *Crit Care*. 2012;16(3):R108.
87. Hermeling E, Reesink KD, Reneman RS, Hoeks AP. Measurement of local pulse wave velocity: effects of signal processing on precision. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(5):774-81.
88. Vappou J, Luo J, Okajima K, Di Tullio M, Konofagou E. AORTIC PULSE WAVE VELOCITY MEASURED BY PULSE WAVE IMAGING (PWI): A COMPARISON WITH APPLANATION TONOMOMETRY. *Artery Res*. 2011;5(2):65-71.
89. Murgu JP, Westerhof N, Giolma JP, Altobelli SA. Aortic input impedance in normal man: relationship to pressure wave forms. *Circulation*. 1980;62(1):105-16.
90. Segers P, Kips J, Trachet B, Swillens A, Vermeersch S, Mahieu D, et al. Limitations and pitfalls of non-invasive measurement of arterial pressure wave reflections and pulse wave velocity. *Artery Research*. 2009;3(2):79-88.
91. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257-65.
92. Frick M, Neunteufl Th, Schwaracher SP, Wascher ThC, Weidinger F für die Arbeitsgruppe "Endothelfunktion und Atherosklerose" der ÖsterreichischenKardiologischen Gesellschaft. Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert. *J Kardiol* 2002;9(10):439-44
93. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J*. 2003;146(1):168-74.
94. Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med*. 2007;12(1):13-6.
95. Moerland M, Kales AJ, Schrier L, van Dongen MG, Bradnock D, Burggraaf J. Evaluation of the EndoPAT as a Tool to Assess Endothelial Function. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:904141.

96. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021-104.
97. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95.
98. Lee HY, Oh BH. Aging and arterial stiffness. *Circ J*. 2010;74(11):2257-62.
99. Munakata M. Brachial-ankle pulse wave velocity in the measurement of arterial stiffness: recent evidence and clinical applications. *Curr Hypertens Rev*. 2014;10(1):49-57.
100. Zhang M, Bai Y, Ye P, Luo L, Xiao W, Wu H, et al. Type 2 diabetes is associated with increased pulse wave velocity measured at different sites of the arterial system but not augmentation index in a Chinese population. *Clin Cardiol*. 2011;34(10):622-7.
101. Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, et al. Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2014;16(9):629-33.
102. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7(1):40-53.
103. Adams Mark R, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen Keld E, Deanfield John E, et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32(1):123-7.
104. Raitakari OT, Seale JP, Celermajer DS. Impaired vascular responses to nitroglycerin in subjects with coronary atherosclerosis. *American Journal of Cardiology*. 2001;87(2):217-9.