

Diplomarbeit

**Polyklonale Serum-Immunglobulin-Leichtketten als
Biomarker für Atherosklerose bei Diabetes mellitus Typ 2**

**Eine retrospektive Datenauswertung einer prospektiven 2-Jahres-Studie an 97
PatientInnen.**

Eingereicht von

Julian Augustin Christopher Zedler

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

An der

Medizinischen Universität Graz

Ausgeführt an der

Klinik für Innere Medizin, Klinische Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel

Unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Harald Sourij

Dr. scient. Med. Norbert Tripolt

Graz, 22.02.2016

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 22.02.2016

Julian Augustin Christopher Zedler eh.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungen	6
3	Abbildungsverzeichnis.....	8
4	Tabellenverzeichnis.....	9
5	Zusammenfassung.....	10
6	Abstract	11
7	Einleitung.....	12
7.1	Atherosklerose.....	13
7.2	Pathophysiologie	14
7.2.1	Diffusion von Lipiden	14
7.2.2	Ansammlung und Oxidation	15
7.2.3	Rekrutierung von Makrophagen	15
7.2.4	Schaumzellbildung.....	16
7.2.5	Einwanderung Glatter Muskelzellen	19
7.2.6	Nekrose und Lipidkernbildung	21
7.2.7	Thrombosierung und Plaque-Ruptur.....	22
7.3	Humorale und Zelluläre Immunantwort	23
7.3.1	T-Zell-Funktion.....	25
7.3.2	B-Zell-Linien und Funktion.....	26
7.3.3	B-Zellen und Atherosklerose	28

7.3.4	Immunglobuline.....	29
7.4	Diabetes und Atherosklerose	30
7.4.1	Epidemiologie	31
7.4.1.1	Koronare Herzkrankheiten	31
7.4.1.2	Periphere Arterielle Verschlusskrankheiten	31
7.4.1.3	Zerebrovaskuläre Erkrankungen	31
7.4.2	Pathologische Mechanismen diabetischer Vaskulopathien.....	32
7.4.2.1	Endothelzellen.....	32
7.4.2.2	Glatte Muskelzellen.....	33
7.4.2.3	Hämostase.....	33
7.5	Diagnostische Parameter	35
7.5.1	Karotis-Intima-Media-Dicke und Plaque-Aumaß	35
7.5.2	C-reaktives Protein	36
7.5.3	Polyklonale Freie Serum-Leichtketten	37
7.5.3.1	FLC und Nierenfunktion	38
7.5.3.2	FLC und Kardiovaskuläre Krankheiten	39
7.5.3.3	FLC und Diabetes.....	39
8	Methoden.....	40
8.1	PatientInnen	40
8.2	Studiendesign	41
8.3	Labor-Messungen.....	41
8.3.1	Serum-Leichtketten (FLC)	41

8.3.2	High Sensitive C-reactive Protein (hsCRP).....	41
8.4	Karotis-Intima-Media-Dicke (cIMT).....	41
8.5	B-Score.....	42
8.6	Statistische Analyse.....	42
9	Ergebnisse.....	43
9.1	Baseline-Charakteristika.....	43
9.2	Korrelation und Regression.....	45
10	Diskussion.....	50
10.1	Serum Leichtketten und Atherosklerose.....	51
10.2	Serum Leichtketten und C-reaktives Protein.....	51
10.3	Studienkohorte und Studienablauf.....	52
10.4	Ausblick.....	52
11	Literaturverzeichnis.....	54

2 Abkürzungen

AcLDL	Acetylated low density lipoprotein
AGE	Advanced Glycation Endproduct
ALCAM	Leucocyte-cell adhesion molecules
AP-1	Activator protein 1
ATLO	Aortic tertiary lymphatic organ
BCRs	B-Zell Rezeptoren
CCL-2	Monocyte chemotactic protein 1
CDR	Complementarity determining region
CRP	C-Reaktives-Protein
CVD	Cardiovascular diseases
DM2	Diabetes Mellitus Typ 2
eGFR	Geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate mittels MDRD
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GpIb	Glykoprotein 1b
Hb1AC	Glykohämoglobin
HDL	High density lipoprotein
hsCRP	High Sensitive CRP
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC2	Typ 2 angeborene lymphoide Zelle
IRA B cell	Innate response activator B cell
KHK	Koronare Herzkrankheiten
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure

MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NCD	Noncommunicable Diseases
NFκB	Nuclear factor κB
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitoren
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Plateled-derived growth factor
PI-3-K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PK1	Proteinkinase 1
PRR	Pattern Recognition Receptors
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SR-A	Scavenger receptor class A
TCRs	T-Zell Rezeptoren
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
Treg	Regulatorische T-Zellen
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	Very late antigen 4
VLDL	Very low density lipoprotein
VWF	Von Willebrand Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Bildung eines Fatty Streaks..	19
Abbildung 2 Voranschreiten der Läsion	20
Abbildung 3 Lipidkernbildung und Plaque-Ruptur	22
Abbildung 4 Schematischer Überblick eines Querschnitts durch eine Atherom	23
Abbildung 5 Angeborene und erworbene zelluläre Antwort	25
Abbildung 6 Potentielle Rolle von ApoB-Proteinen als Verstärker der Immunantwort bei Atherosklerose	26
Abbildung 7 Rolle von B Zellen in Athersoklerotischen Plaques	29
Abbildung 8 Auswirkung der chronischen Hyperglykämie auf die Atherogenese	35
Abbildung 9 Studienübersicht	43
Abbildung 10 Häufigkeitsverteilung freier Leichtketten	45
Abbildung 11 Korrelation der Mittelwerte cFLC und B-Score am Zeitpunkt Baseline	47
Abbildung 12 Korrelation der Mittelwerte cFLC mit dem Plaque-Ausmaß geordnet in 3 Kategorien	48
Abbildung 13 Korrelation der cIMT und cFLC Baseline nach Pearson	48
Abbildung 16 Matrix der Korrelationen cIMT und cFLC unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens und Geschlechts	49
Abbildung 17 Korrelationen der beiden Entzündungsmarker cFLC und hsCRP zu Baseline und nach 3 Monaten	50

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verschieden Scavenger-Rezeptoren und deren Rolle bei Kardiovaskulären Krankheiten	17
Tabelle 2 Mittelwert/Median der Werte für die Konzentration freie Serum Leichtketten	38
Tabelle 3 Kriterien für die Kategorisierung des B-Scores in 3 Gruppen.....	42
Tabelle 4 Baseline-Charakteristika der Studienpopulation	44
Tabelle 5 Korrelationsanalysen cFLC Baseline.....	46
Tabelle 6 Korrelationsanalysen cIMT Baseline.....	46

5 Zusammenfassung

Hintergrund: PatientInnen mit Diabetes Typ 2 haben im Vergleich zu Nicht-DiabetikerInnen ein 2- bis 4-fach höheres Risiko an Herz-Kreislauf-Krankheiten zu erkranken. Atherosklerose und Plaquebildung werden stark vom Immunsystem beeinflusst, auch unter Beteiligung von B-Zellen. Kürzlich veröffentlichte Studien legen das Potential polyklonaler freier Serum Immunglobulin Leichtketten (cFLC) als Biomarker für Herz-Kreislauf Erkrankungen bei PatientInnen mit Diabetes Typ 2 nahe. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb einen potentiellen Zusammenhang zwischen cFLC und Atherosklerose der Karotiden, gemessen mittels Ultraschall, zu beschreiben.

Methoden: Diese prospektive, offene 2-Jahres-Studie wurde an 97 PatientInnen mit Diabetes Typ 2 durchgeführt. Die PatientInnen hatten mindestens zwei unzureichend behandelte kardiovaskuläre Risikofaktoren d.h. HbA1c > 7.5% (58 mmol/mol); LDL-Cholesterin > 3.1 mmol/l oder Blutdruck > 140/90 mmHg. Die Daten für cFLC und hoch sensitivem C-reaktivem-Protein (hsCRP) waren für insgesamt 75 PatientInnen verfügbar. Die Intima-Media-Dicke und der B-Score der Karotiden wurde mittels Ultraschall gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels deskriptiver und explorativer Datenanalyse.

Ergebnisse: Es wurden signifikant positive Korrelationen zwischen cFLC und B-Score ($r=0,38$; $p=0,001$) ebenso wie zwischen cFLC und hsCRP ($r=0,35$; $p=0,002$) beobachtet. Die Korrelation zwischen cIMT und cFLC war statistisch nicht signifikant ($r=0,22$; $p=0,058$).

Fazit: Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Assoziation und einen beachtenswerten Anstieg der cFLC-Plasma-Spiegeln und dem Plaque-Ausmaß, gemessen mittels B-Score. Es sind jedoch weitere Analysen mit größeren Fallzahlen notwendig, um diese Assoziation zwischen freien Leichtketten im Plasma und Atherosklerose zu bestätigen

6 Abstract

Background: Patients with Type 2 Diabetes Mellitus have a 2-4-fold higher risk of cardiovascular events compared to the non-diabetic population. Atherosclerosis and plaque formation is strongly influenced by different arms of the immune system, including B-lymphocytes. Recent investigations suggest combined free serum light chains (cFLC) as a potential biomarker for cardiovascular events. Therefore, our aim was to assess the association of cFLC with carotid atherosclerosis measured by ultrasound, a well-established surrogate parameter for cardiovascular events.

Methods: We performed a cross-sectional analysis in data from a prospective single center 2-year study of 97 patients with type 2 diabetes and at least two insufficient treated cardiovascular risk factors, i.e. HbA1c > 7.5% (58 mmol/mol); LDL-cholesterol >3.1 mmol/l or blood pressure >140/90 mmHg. Complete data on cFLC, high sensitive C-reactive protein (hsCRP) was available for 75 subjects. Carotid intima media thickness (CIMT) and a B-score to quantify plaque burden was determined according to the Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study protocol (ACAPS). The data was compared using explorative statistical analysis.

Results: Significant positive correlations between cFLC and the B-score ($r=0,38$; $p=0,001$) as well as cFLC and hsCRP ($r= 0,35$; $p=0,002$) were observed. The correlation between CIMT and cFLC ($r=0,22$; $p= 0,058$) did not reach statistical significance.

Conclusion: In our study, cFLC was associated with carotid atherosclerosis, measured by the B-score in subjects with type 2 diabetes. However, further larger trials need to confirm this association and determine whether cFLC could be used as a potential biomarker for atherosclerosis and future cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes

7 Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) betitelt die Verbreitung nicht übertragbarer Krankheiten als eine der grössten medizinischen Bürden des 21. Jahrhunderts, denn sie verursachen jetzt schon mit ca. 63% bei weitem die meisten Todesfälle weltweit (1, 2). Nicht-übertragbare-Krankheiten (NCDs) werden in vier Kategorien eingeteilt: Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Krankheiten der Atmungsorgane und Diabetes mellitus. Ihre Gemeinsamkeit besteht darin, dass sie einen chronischen Verlauf aufweisen und größtenteils vermeidbar sind, wie etwa durch veränderte Lebenseinstellung beim Rauchverhalten, Ernährung oder Bewegung. Sie sind ausserdem durch eine relativ lange Entstehungsperiode gekennzeichnet und bieten hierfür einen guten Angriffspunkt um frühzeitig einzugreifen.

Vorsorge und Aufklärung spielen bei der Bekämpfung von NCDs die weitaus wichtigste Rolle. Dort wo diese Maßnahmen jedoch nicht greifen, ist die frühe Erkennung essentiell um therapeutische Maßnahmen einzuleiten, regelmäßige Kontrollen einzuführen und gravierende Komplikationen zu vermeiden oder zu verzögern. In diesem Zusammenhang richtet sich der Fokus wissenschaftlicher Arbeiten auf dem Gebiet der Früherkennung auf sogenannte Biomarker, deren Messung auf biologische, pathologische und pharmakologische Prozesse im Körper zurückführen sind.

Es gibt bereits eine Fülle an neuen Biomarker als Kandidaten für die Früherkennung auf dem Gebiet der kardiovaskulären Krankheiten und des Diabetes mellitus. Viele haben bisher keinen signifikanten Vorteil gegenüber bisher im klinischen Alltag gängigen Risikoscores, die auf einfach verfügbaren und etablierten Risikofaktoren wie Blutdruck, Gewicht oder älteren Biomarkern wie Blutfetten oder glykosyliertem Hämoglobin (HbA1C) basieren. Bei weltweit immer höherer Inzidenz von NCDs sind aber zusätzlich weitere Marker vonnöten, um der Komplexität dieser Krankheiten gerecht zu werden, und vor allem um vorhandene Risiko-Scores zu erweitern und deren Vorhersagequalität zu verbessern.

Der Erforschung von Markern auf dem Gebiet der NCDs liegt der Gedanke zugrunde, dass eine frühe Erkennung und konsekutive frühe Behandlung nicht nur einen Nutzen für den Einzelnen in sich bergen, sondern auch einen gesellschaftlichen und volkswirtschaftlichen

Benefit besitzen. Es wird geschätzt, dass bis zum Jahr 2035 mehr als 592 Millionen Menschen an Diabetes mellitus leiden werden die bisher schon einen gesamt-wirtschaftlichen Schaden von über 600 Milliarden Dollar verursachen (3-5). Diese Population ist einem 2 bis 4-fach erhöhtem Risiko kardiovaskulärer Komplikationen ausgesetzt (6), was die Zahl von mehr als 17 Millionen jährlichen Todesfällen an den Folgen kardiovaskulärer Komplikationen in den nächsten Jahren stetig erhöhen wird. Zusätzlich ist auch das Risiko für mikrovaskuläre Komplikationen bis hin zur Dialysepflicht und Erblindung signifikant erhöht. Was letztendlich die globale wirtschaftliche Last des Diabetes und dessen Begleiterkrankungen als eine der Herausforderungen des 21. Jahrhunderts für Gesundheitssysteme weltweit darstellt (7).

Die pathophysiologischen Mechanismen, die als Grundlage zur effektiven Erforschung neuer Früherkennungsmethoden nötig sind, und noch nicht gänzlich verstanden werden, sind Gegenstand aktueller Forschung. Diese pathophysiologischen Grundlagen zu verstehen ist von großer Wichtigkeit für die Erkennung und Prävention von Gefäßereignissen, denn der plötzliche Herztod und der akute Myokardinfarkt sind die initialen Manifestationen die bei mehr als der Hälfte der Individuen mit Atherosklerose auftreten (8).

In den letzten Jahren ist die Tatsache, dass Atherosklerose vor allem ein entzündliches Geschehen ist, durch Grundlagenforschung und Klinische Evidenz bestätigt worden. Entzündung gilt als fundamentaler Vorgang bei Atherosklerose im Menschen (9).

Aus dem Wissen um die entzündliche Natur der Atherosklerose und die unverkennbare Verkettung mit chronischer Hyperglykämie generierte sich für diese Arbeit die Hypothese, dass polyklonale Antikörper eine entscheidende Rolle in der Atherogenese bzw. der Prädiktion von Atherosklerose und nachfolgender vaskulärer Komplikationen spielen.

7.1 Atherosklerose

Als klassische Definition der Atherosklerose kann die chronische, systemische Verdickung von Arterien durch Einlagerung von oxidiertem LDL in deren Wand und die darauf folgenden entzündlichen Komplikationen angesehen werden (10). Sie ist als eine Unterkategorie der Arteriosklerose anzusehen, die als Versteifung der Arterienwände beschrieben wird und zusätzlich die Einlagerung von Thromben und Kalk in den Gefäßen beinhaltet (11). Die

Komplikationen der Atherosklerose, allem voran Herzinfarkte, Schlaganfälle oder akute Gefäßverschlüsse in anderen Strombahnen sind die meist verbreiteten Todesursachen in der westlichen Welt, so werden ihnen jährlich fast 17 Millionen Todesfälle angerechnet (1, 12, 13).

Die klassische Definition wird der heutigen Sicht auf den äußerst komplexen immunologischen Prozess der Atherogenese jedoch nicht gerecht, denn Atherosklerose ist weit mehr als die bloße Ansammlung von Lipiden, so wie es über viele Jahrzehnte gelehrt wurde. Der heutige Fokus richtet sich vor allem auf die entzündliche Komponente und die komplizierten Immunologischen Prozesse die sie begleiten.

Seit der Etablierung der Biochemie, der Zellforschung und Molekularbiologie vor über 50 Jahren ist das schwierige Bild dieser chronischen Erkrankung immer genauer geworden. Zwar wusste schon Rudolf Virchow von der entzündlichen Komponente der Atherosklerose (9) jedoch wurde sein Konzept erst über ein Jahrhundert später wiederaufgenommen, die heute als gesichert gilt.

7.2 Pathophysiologie

Die ursprüngliche These der Atherosklerose-Bildung ist die erstmals durch Ross et. 1977 postulierte Response-to-Injury-Hypothese die eine Initiierung des atherosklerotischen Plaques durch eine Verletzung der Intima voraussetzt (14). Demnach sind drei Hauptereignisse notwendig für die Bildung atherosklerotischer Läsionen: 1. Intima-Proliferation glatter Muskelzellen, 2. Bildung großer Mengen Bindegewebe durch ebendiese Zellen, und 3. Einlagerung von Lipiden die sich schlussendlich zu einem Lipidkern formieren.

Heutzutage wird eher von der endothelialen Dysfunktion als initiales Geschehen in der Kaskade ausgegangen (15).

7.2.1 Diffusion von Lipiden

Als Initialveränderung der histologischen Zusammensetzung auf dem Weg zu atherosklerotischen Plaques wird die Einlagerung von Lipiden, Cholesterin und LDL in die arterielle Intima beschrieben. Sie beginnt schon in der frühen Jugend und Kindheit(16). LDL-Partikel bestehen aus einem hydrophoben Kern von Cholesterinestern und Triglyceriden,

ummantelt von einer Schicht an polaren Phospholipiden, freiem Cholesterin und dem LDL-spezifischem APO Protein, dem apoB100.

Dieser Prozess entsteht einerseits durch die Aufnahme in die Intima über den spezifischen LDL-Rezeptor, jedoch hauptsächlich durch freie Diffusion in die Endothelschicht. Durch diese Diffusionsprozesse sind folglich jene Punkte im arteriellen Kreislauf für Einlagerungen prädestiniert, an denen die Flussgeschwindigkeit und Scherkräfte herabgesetzt sind(17) oder bei denen die Wand-Elastizität herabgesetzt und der retrograde Blutfluss verlangsamt ist(18).

7.2.2 Ansammlung und Oxidation

Als weitere Folge verminderten Flusses, heften sich sukzessive Lipoproteine niederer Dichte an die in der Intimamatrix befindliche Proteoglykane an und verbinden sich zu sehr oxidierungsanfälligen Komplexen (19). Die Oxidation des LDL-Cholesterins wird unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bewerkstelligt, die sich primär an Doppelbindungen ungesättigter Reste von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterinestern binden (20). Diese posttranslationalen Proteinveränderungen verändern in weiterer Folge deren immunogene Eigenschaften (21).

Bei der Oxidierung sind Veränderungen von Ladung, Größe, Lipid-Inhalt und weiteren Eigenschaften, die das ganze Partikel betreffen, zu bemerken. Oxidiertes LDL ist somit nicht eine exakt definierte molekulare Spezies, sondern präsentiert sich vielmehr als ein breites Spektrum an Partikeln mit einer großen Heterogenität an postrationalen Tertiärstrukturen der Oberflächenproteinen. Es entsteht ein sehr heterogenes Gemenge an Partikeln die eine Vielzahl an entzündungsreaktionen hervorrufen können und ein weitaus komplexeres Bild der Atherogenese liefern.

7.2.3 Rekrutierung von Makrophagen

Bei der pathologischen Modifizierung dieser Lipidkomplexe durch Oxidierung kommt es schließlich zu einer Ausschüttung von Phospholipiden. Ebenso wie der verlangsamte Blutfluss bedingt dies die Stimulierung der lokalen Endothelzellen, die zu einer Expression von Adhensions-Molekülen an der luminalen Oberfläche wie VCAM-1, ICAM-1, P-Selectin und E-Selectin angeregt werden (22-24).

Da beim Gesunden, Leukozyten nicht an Endothelzellen haften, kann man die Expression dieser Adhäsions-Moleküle als den Startschuss des Entzündungsprozesses bezeichnen (25). Besonders interessant ist das Adhäsions-Molekül VCAM-1, denn es interagiert spezifisch mit VLA-4, einem Integrin-Dimer das von Monozyten und T-Zellen exprimiert wird, die sehr spezifisch in atheromatösen Anfangsläsionen anzufinden sind (25). Andere Selectine sind weniger Atheromspezifisch, tragen jedoch zur Akkumulation einer sehr heterogenen Menge an verschiedenen Monozyten-Subklassen in diesen Läsionen bei (26).

Einmal am Endothelium haftend, benötigen Leukozyten ein Signal um die endotheliale Schicht transzytotisch zu passieren und in die Intima-Matrix zu gelangen. Dieses Signal wird von Chemokinen weitergeleitet (27). Eines dieser Chemokine, das MCP-1 oder CCL2 ist hier von besonderer Bedeutung, da oxLDL eines der Hauptstimuli für die Produktion von CCL2 durch Endothelzellen ist und es außerdem sehr selektiv die gerichtete Chemotaxis von Monozyten begünstigt (28).

Obwohl die Rekrutierung von Monozyten in der Gefäßwand und deren Veränderung zu Makrophagen eine Initial protektive Funktion hat indem sie zytotoxisches und entzündungsförderndes oxLDL oder apoptotische Zellen aufnehmen, führt die progressive Anhäufung dieser Makrophagen schlussendlich zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.

Diese Akkumulation mononuklearer Phagozyten hängt nicht nur von dem Influx ab der durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelt wird, sondern auch von deren Retention innerhalb des Plaques. Hier wurde vor allem Netrin-1 als Paracrines Molekül in Läsionen isoliert, das durch Rezeptorbindung (UNC5b) Entzündungszellen im Atherom zurückhält (29).

7.2.4 Schaumzellbildung

Die Besonderheit atheromatöser Läsionen ist die große Anhäufung von sogenannten Schaumzellen ("foam cells"), die eine massive Menge an verschiedenen Cholesterinester in sich aufweisen. Die ungehemmte und konzentrationsunabhängige Aufnahme dieser Cholesterin-Verbindungen wird nicht von den klassischen LDL-Rezeptoren sondern hauptsächlich durch spezifisch modifiziertes LDL-erkennende Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen vermittelt, eine Klasse an PRR's aus verschiedenen

Transmembranproteinen bestehend (30, 31). Da diese Rezeptor-Familie für viele komplexe Funktionen verantwortlich ist, von der Aufnahme von modifiziertem LDL und Zelldetritus bis zur lysosomalen Verarbeitung dieser Partikel, sind Scavenger Rezeptoren von besonderer Bedeutung für die weitere Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Vgl. Tabelle 1).

<i>Klasse</i>	<i>Scavenger receptor</i>	<i>Beteiligung an Kardiovaskulären Krankheiten?</i>
A	SR-A	OxLDL-Aufnahme durch Makrophagen
A	MARCO	Nein
B	SR-B	Reduziert Atherosklerose durch Cholesterin-Rücktransport von HDL
B	CD36	OxLDL-Aufnahme durch Makrophagen. Führt zur Bildung von Schaumzellen
E	LOX-1	OxLDL uptake in Endothelzellen. Führt zur Endothelzellendysfunktion
F	SRECI/II	Aufnahme von niedrigen Mengen an AcLDL
G	SR-PSOX	OxLDL-Aufnahme durch Makrophagen

Tabelle 1 Verschieden Scavenger-Rezeptoren und deren Rolle bei Kardiovaskulären Krankheiten. Adaptiert nach Stephen et. al. (32)

Das Cholesterin, das sich in großen Mengen innerhalb von Makrophagen schließlich ansammelt, formt in weiter Folge intrazelluläre Kristalle. Deren Bildung hängt letztendlich von der Aufnahme und der Balance von freiem Cholesterin und Cholesterinestern sowie dem Ausströmen und Bindung an ApoE-Lipoproteinen ab (33). Solche Intrazellulären Mikrokristalle begünstigen durch Ihre Form und Konsistenz die Nekrosierung der Monozytären Makrophagen und verstärken somit weiter Entzündungen in Plaques sklerosierter Wände (20).

Zu der fokalen Anhäufung von Schaumzellen, die im Widerspruch zur systemischen Theorie der Atherosklerose steht, ist in Kapitel 7.2.1 die Theorie der mechanischen Scherkräfte angesprochen worden. Eine weitere Theorie verbindet lokal erhöhte Scherkräfte mit der Verminderung vasoaktiver Substanzen die Funktion und Struktur der Gefäße regulieren (24).

Zu diesen Substanzen die von der Endothelzellschicht synthetisiert werden, gehören neben Prostaglandinen, Endothelin und Angiotensin II vor allem Stickstoffmonoxid (NO). NO erweitert stark die Gefäße und vermittelt als hauptsächliche endogene Substanz die Kontrolle über deren Entspannungszustand (34); zudem inhibiert es die Aktivierung von Thrombozyten, reduziert Entzündungen durch die Unterbindung der Leukozyten-Wanderung, und verhindert die Vermehrung und Wanderung von glatten Muskelzellen in der Media (34, 35). Auf biochemischem Level, ist vor allem die Theorie beständig, dass laminarer Scher-Stress durch Mechanotransduktion eine erhöhte Produktion von Superoxiddismutase und NO-Synthase mit sich führt (24). An Stellen verminderten Flusses ist dadurch die Produktion atheroprotektiver Faktoren herabgesetzt. Vermindertes NO, erhöhter oxidativer Stress und AGES-Rezeptoren erhöhen schlussendlich die lokale Aktivierung von NF κ B und AP-1, zwei Transkriptionsfaktoren die eine Expression einer Vielzahl atherogenetischer Mediatoren vorantreiben. Zu diesen zählen ALCAM, CCL-2, sowie Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF α (36, 37).

Einmal in der Intima angekommen, und nach deren Weiterbildung zu Schaumzellen, besitzen Makrophagen die Fähigkeit sich in den etablierten Läsionen zu mehren. Dies wird hauptsächlich durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie M-CSF, GM-CSF und Interleukin-3 vermittelt (31).

Dieser bisher beschriebene Prozess der entstehenden Atheromata ist bis zu diesem Zeitpunkt tatsächlich noch umkehrbar, da diese nur aus Lipid-beladenen Makrophagen bestehen und noch nicht komplexe Bestandteile wie Fibrosierungen, Thrombosierungen, Nekrosen oder Kalzifizierungen enthalten. Der Prozess der Umkehrung ist noch nicht vollkommen verstanden und wird kontrovers diskutiert.

Die Rolle mononuklearer Phagozyten als aktive Effektoren wurde spätestens mit der Entdeckung Makrophagen-Emittierter Zytokine, wie CCL-2, IL-1 und TNF- α , bestätigt und wird als pathologischer Mechanismus der angeborenen Immunität beschrieben. Es steht der entzündliche Prozess im Vordergrund der durch diese Zytokine angestoßen wird. Der

Komplexe Immunologische Prozess und vor allem die Rolle zellvermittelter Immunantwort durch die B-Zell-Reihe, soll in Kapitel 7.3.2 genauer beschrieben werden.

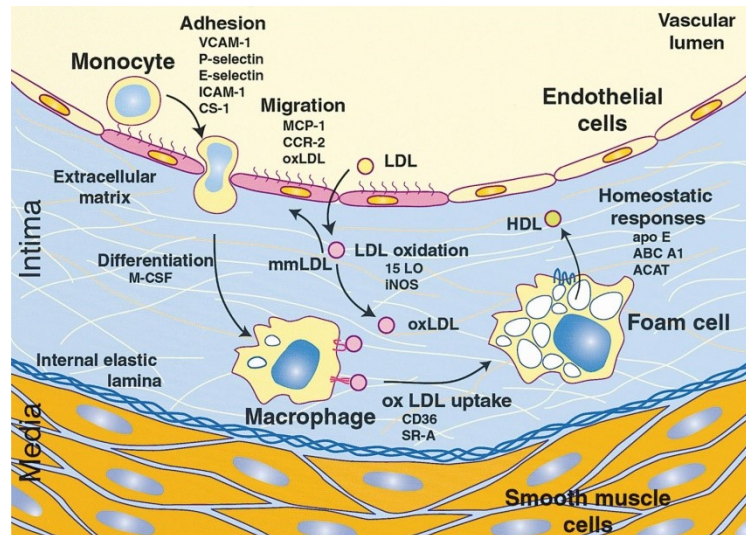


Abbildung 1 Bildung eines Fatty Streaks. Die Oxidation von LDL löst eine Entzündungskaskade aus. Nach Adhäsion und Einwanderung der Monozyten in die Intima bilden diese sich durch M-CSF-Aktivierung zuerst zu Makrophagen und anschließend durch Aufnahme des oxidierten LDL zu Schaumzellen weiter. Dieser Prozess ist reversibel.

7.2.5 Einwanderung Glatter Muskelzellen

Die reversiblen Anfangsstadien der Atherombildung sind durch endotheliale Dysfunktion, sowie Leukozyten-Rekrutierung und -Ansammlung bestimmt. Der weitere Übergang von einem simplen Fatty Streak in eine komplexere Läsion ist durch die Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima gekennzeichnet, die einen großen Einfluss auf die Homöostase des normalen Blutflusses besitzen. Durch Kontraktion und Entspannung gelangt eine Kontrolle des Flusses in den verschiedenen arteriellen Gefäßbetten bis in den Arteriolen (38). In größeren Gefäßen, können jedoch abnorme Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen zu Vasospasmen führen, was oft zu Verschlimmerung von Stenosen und größeren Komplikationen führt (39). Glatte Muskelzellen produzieren außerdem eine Fülle an Stoffen für die extrazelluläre Matrix und tragen damit zu einem großen Teil zur Entwicklung und

Komplikation atherosklerotischer Plaques bei. Sie migrieren und proliferieren auch gerne und tragen somit zur Bildung hyperplastischer Foci in der Intima bei, was oft vor allem bei der Restenosierung bei Stent-Implantationen zu beobachten ist und ein großes Problem darstellt (40).

Die Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Tunica media arterieller Gefäße wird auch mittlerweile kontrovers diskutiert. Es wird eine pathologische Einwanderung und Vermehrung glatter Muskelzellen aus ansässigen Stammzellen in fortgeschrittenen Atheromata beschrieben (41, 42). Da aber viele glatte Muskelzellen in entwickelnden Atheromata sich stark von Zellen der normalen Tunica Media unterscheiden wird eine hämatogene Streuung Glatter Muskelzellen nicht ausgeschlossen (43).

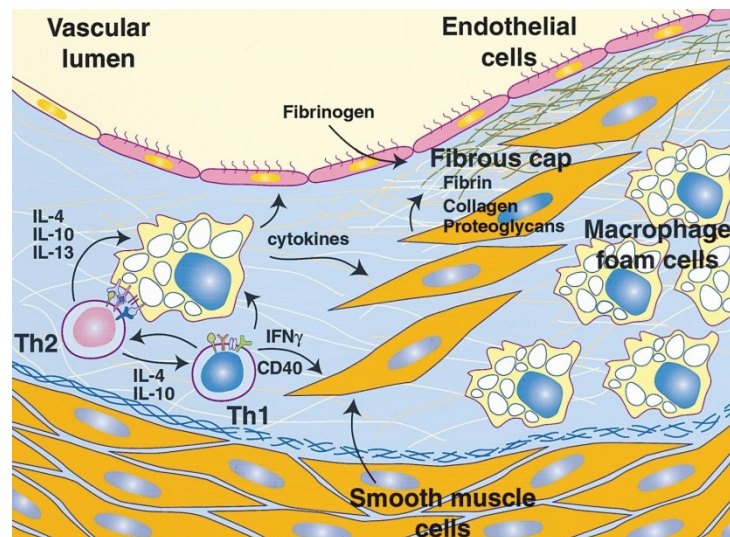


Abbildung 2 Voranschreiten der Läsion und Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima. Stimulierung glatter Muskelzellen durch Th1 Zellen durch IFN γ . Stimulierung von Makrophagen durch Th2 Zellen die in weiterer Folge sich ansammeln und absterben (12)

Zusätzlich zu deren Rekrutierung und Vermehrung ist auch die Zytokin und T-Zell-getriggerte Apoptose jener Zellen ein Grund für die fortschreitende Komplikation des atheromatösen Plaques (44). So exprimieren T-Zellen in Atheromata Fas-Liganden, die mit deren entsprechenden Rezeptoren aus der Familie der TNF-Rezeptoren an der Oberfläche glatter Muskelzellen interagieren und zusammen mit Zytokinen zur Apoptose führen (45).

Letztendlich ist die Ansammlung glatter Muskelzellen im Plaque das Subtraktions-Ergebnis aus deren Vermehrung und Apoptose. Der zunehmende Verlust glatter Muskelzellen in atherosklerotischen Herden führt in weiterer Folge zur Destabilisierung des Plaques und ist Grundvoraussetzung für dessen Ruptur. Denn der Großteil der Masse besteht aus extrazellulärer Matrix und nicht aus Zellen. Zu den Bestandteilen gehören Kollagene, Proteoglykane und elastische Fasern die beim Gesunden in der arteriellen Media standardmäßig durch Glatte Muskelzellen produziert werden. Stimuli zu einer exzessiven Produktion kommen durch Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β oder Zytokinen, die von vielen Zellen in diesen Läsionen produziert werden (46).

Wie auch bei den produzierenden glatten Muskelzellen selbst, ist die Anhäufung Extrazellulärer Matrix ebenfalls ein Ergebnis von Produktion und Abbau, und führt anfangs zu einer Anhäufung rund um die Entzündungsherde. Ein Gegenspieler in diesem Fall sind katabole Enzyme in der Matrix, sogenannten Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP's), die unter anderem von Makrophagen exprimiert werden und für die Destrukturierung der Matrix sorgen. Proinflammatorische Zytokine triggern die Produktion von MMP's, vor allem von MMP-1, MMP-8, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 in menschlichen Atheromata (47, 48). Deren Überproduktion ist im späteren Verlauf ein gravierender negativer Faktor für die biomechanische Stabilität des Interstitiums fibröser Plaques, da es diese schließlich für Rupturen prädisponiert (47, 49).

7.2.6 Nekrose und Lipidkernbildung

Im weiteren Entwicklungsverlauf atherosklerotischer Läsionen gehen immer mehr Schaumzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen durch Apoptose zugrunde. Vor allem das Absterben von Makrophagen durch Überladung mit Cholesterin-Kristallen führt zu sogenannten Lipidkernen (9), während die Apoptose glatter Muskelzellen zu weiteren Komplikationen des Herdes und Bildung sogenannter Nekrotischer Kerne führt (44). Wie oben erwähnt, führt das Absterben glatter Muskelzellen zur verminderten Produktion von Kollagen und zur Destabilisierung Fibröser Plaques. Auch sammeln sich einige dieser abgestorbenen Zellen durch eine gestörte Efferozytose in den Plaques an und tragen dadurch zur weiteren Progression der Inflammation bei (50).

7.2.7 Thrombosierung und Plaque-Ruptur

Alle oben genannte Phasen der Atherogenese entwickeln sich über viele Jahre, während derer die betroffenen Personen meistens keine Symptome zeigen. Nachdem jedoch die Plaque-Belastung die Fähigkeiten der Arterie, sich zu remodelieren, übersteigt, fängt das Wachstum in das Lumen-Innere an. Ab einem Stenosegrad von ca. 60% kann ein Defizit des Blutflusses bei erhöhtem Sauerstoffbedarf entstehen, was klinisch vor allem zur Erstsymptomatik der stabilen Angina Pectoris bzw. Claudicatio Intermitens führt.

In vielen Fällen Myokardialer Infarktionen oder transienten ischämischen Attacken gibt es jedoch keine Historie stabiler Angina pectoris. Dies führt zur Annahme, dass akute ischämisch kardiale oder zerebrale Vorfälle einer Thrombosierung durch Ruptur nicht-kritischer Stenosen folgen (51). Für zwei Drittel der Thromben ist die Ruptur des fibrösen Plaques verantwortlich. Dazu kommt die superfizielle Erosion der Intima, die für ein Viertel der Fälle verantwortlich ist, und bei Frauen häufiger vorkommt als bei Männern (52, 53).

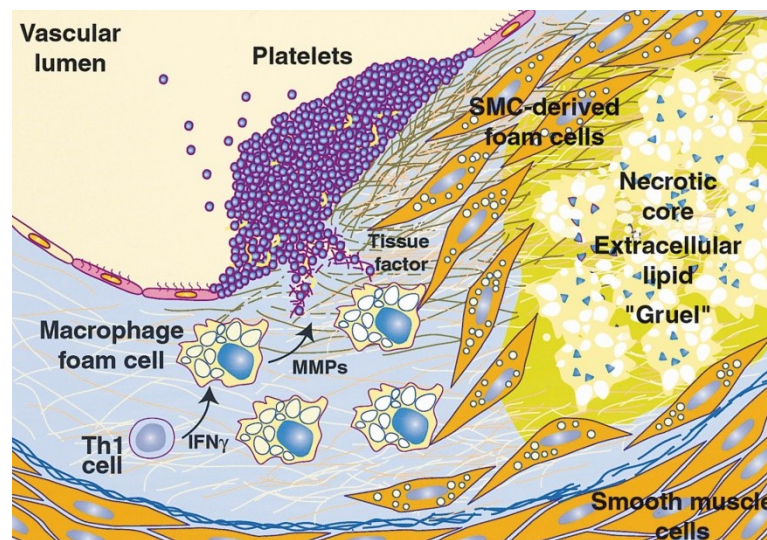


Abbildung 3 Lipidkernbildung, Destrukturierung der Matrix durch MMP's, lumenales Anheften von Thrombozyten an die Intimaläsion. Die Verwandlung glatter Muskelzellen zu Schaumzellen und die Bildung Nekrotischer Kerne führt zur Plaque-Ruptur (12)

Die finale Ruptur des Plaques resultiert sicherlich aus einem Ungleichgewicht zwischen den mechanischen Adhäsionskräften und den Kräften die auf den Plaque wirken. So wurde schon erwähnt, dass die hauptsächliche Stabilisierung des Atheroms durch extrazelluläre Kollagene

verantwortet wird, und deren Fehlregulation höchstwahrscheinlich die Hauptverantwortung für die Plaqueruptur trägt. Dazu gehören das weiter unten erwähnte T-Zell-Emittierte IFN- γ , und katabole Enzyme wie MMPs oder Cathepsin die in der Schlussphase der Atherombildung von Makrophagen überexprimiert werden (54). Die Destabilisierung ist somit letztendlich vor allem Immunvermittelt und geht von Entzündungsmechanismen der Endothelzellen aus, die weitreichende Folgen für den ganzen Plaque besitzen.

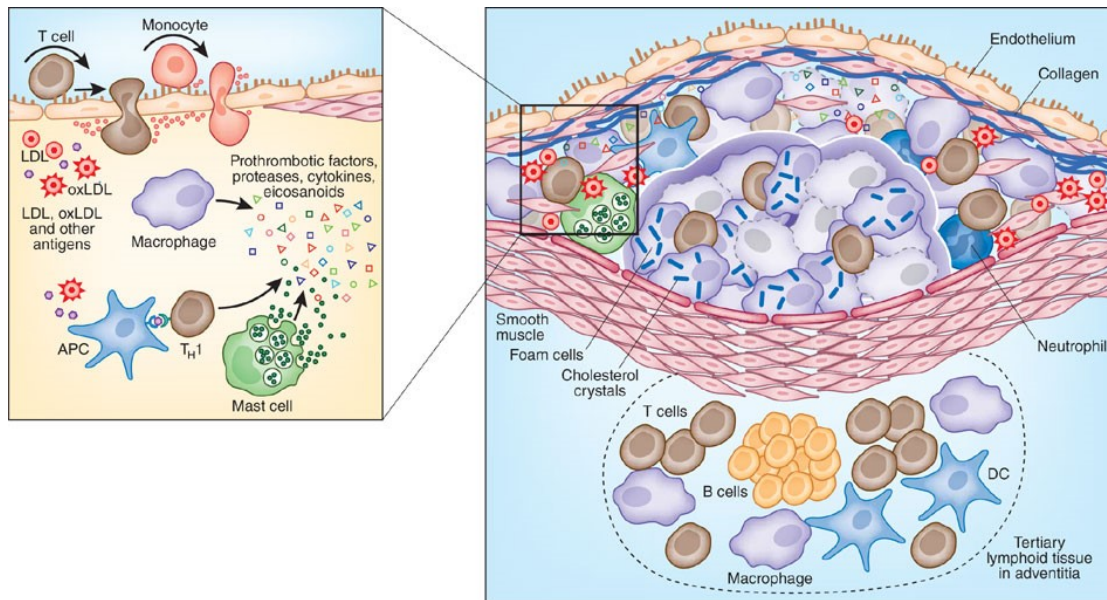


Abbildung 4 Schematischer Überblick eines Querschnitts durch eine Atherom. Tertiäre Lymphorgane (ATLOs) liegen der Adventitia großer Gefäße an (Siehe Kapitel 7.3.3)(55)

7.3 Humorale und Zelluläre Immunantwort

Die Begründung der modernen Immunologie durch Paul Ehrlich und Karl Landsteiner, durch die Antikörper erstmals identifiziert werden konnten, sowie die Entdeckung durch Astrid Fagraeus, dass Antikörper von Plasmazellen gebildet werden, haben die Basis der zellvermittelten Immunologie begründet. Experimentelle Erkenntnisse Immunologischer Vorgänge bei Atherosklerose und moderne bildgebende Verfahren sind so weit fortgeschritten, dass heute diese sehr komplizierten Immunologischen Prozesse der Atherosklerose größtenteils identifiziert und beschrieben werden können.

Vor allem die Arbeit an genetisch modifizierten Mäusen die Atherosklerose und Hypercholesterinämie entwickeln, wie Apo $e^{-/-}$ oder Ldl $r^{-/-}$ Mäusen hat exzellente

Möglichkeiten eröffnet neue Erkenntnisse zellulärer und humoraler Abwehr bei Atherosklerose zu gewinnen (20).

Die bis vor wenigen Jahrzehnten einzig bekannten Abläufe immunologischer Zellen bei Atherosklerose waren die von mononuklearen Monozyten und Makrophagen. Heute weiß man, dass sie eine Verbindung zwischen angeborenem und spezifischem Immunsystem bilden und Teil einer großen Entzündungskaskade sind, die wiederum ein integraler Bestandteil beider Immunsysteme ist. Es besteht aus seiner komplexen Serie an Interaktionen zwischen Mediatoren und Zellulären Effektoren die als Antwort auf Pathogene oder Gewebedefekte emittiert werden. Die angeborene Immunantwort besteht aus Komplement-Proteinen genauso wie aus Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, NK-Zellen und Lymphozyten. Diese Zellen agieren als Pathogen-Erkennende Zellen durch einen genetisch stabilen (und begrenzten) Pool an Rezeptoren wie zum Beispiel Scavenger Rezeptoren. Das Adaptive Immunsystem hingegen ist Antigen-spezifisch und besitzt einen großen Pool an T (CD4+ und CD8+) und B-Zellen, die ein enormes Repertoire an somatisch rekombinanten Rezeptoren besitzen. Diese lassen sich in TCRs (10^{18}) und BCRs (10^{14}) einteilen und besitzen eine sehr große Antigen-Spezifität gegenüber ausgewählten Pathogenen. Somit tragen sie zu zellulärer (durch T-Zellen) und humoraler (durch Immunglobuline von B-zellen) Abwehr bei (56).

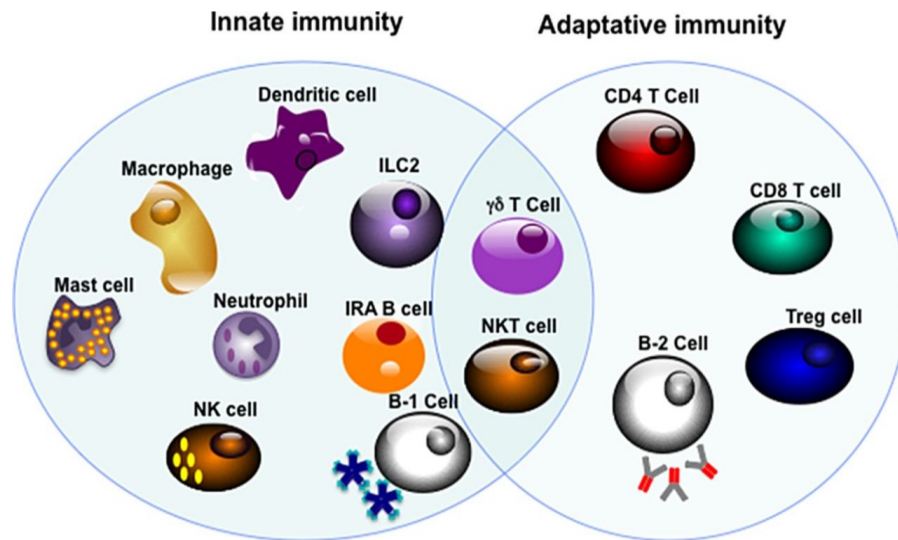


Abbildung 5 Angeborene und erworbene zelluläre Antwort. B-Zellen sind sowohl Teil des angeborenem und des Adaptiven Immunsystems (57)

7.3.1 T-Zell-Funktion

Bei dem kontinuierlich fortschreitendem Prozess der Atherosklerose spielen somit alle Zellen der Immunantwort eine wichtige Rolle (58, 59). Eine detaillierte Beschreibung dieser Zellen und deren Rolle im atherosklerotischen Prozess kann aber nicht in dieser Arbeit gegeben werden. T-Zellen sollen hier trotzdem erwähnt werden, da sie nicht nur direkten Effekt auf die Entzündung im Plaque besitzen, sondern auch eine wichtige Brücke zwischen Atherom-Entwicklung und B-Zell-Rekrutierung sind (60). Ihnen fällt eine entscheidende Rolle bei der immunologischen Abwicklung der Atherosklerose zu indem sie beispielsweise ApoB-Spezifität durch APC-Stimulation entwickeln und stark zur Verschlechterung der Atherosklerose beitragen (Abbildung 6) (20). Zu den in der Mehrzahl CD4 und CD8 Positiven Zellen finden sich TH1-Zellen, die vor allem für die Zytokin-Ausschüttung, wie $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ verantwortlich gemacht werden und einen pro-atherogenen Effekt haben (Abbildung 2, 4, 7) (61), da $\text{INF-}\gamma$ die Proliferation und Kollagenproduktion glatter Muskelzellen hemmt (und somit zu den Hauptverantwortlichen der mechanischen Plaque-Destabilisierung gehört) genauso wie die Expression von Scavenger-Rezeptoren beeinflusst (46). Zudem begünstigt $\text{INF-}\gamma$ die chronische Hyperglykämie (62).

Über die Rolle von TH2-Zellen und TH17-Zellen gibt es bisweilen kontroverse Studien (20), und die initialen euphorischen Theorien der atheroprotektiven Funktion von TH2-Zellen konnte noch nicht bestätigt werden (57).

Die Rolle von NKT-Zellen bei Atherosklerose hat in den letzten Jahren zunehmende Beachtung gefunden. Sie sind eine weitere Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Ihnen wird ein pro-atherogener Effekt in frühen Atherosklerose-Plaques zugeschrieben, was sie zu Forschungsobjekten therapeutischer Intervention macht (57).

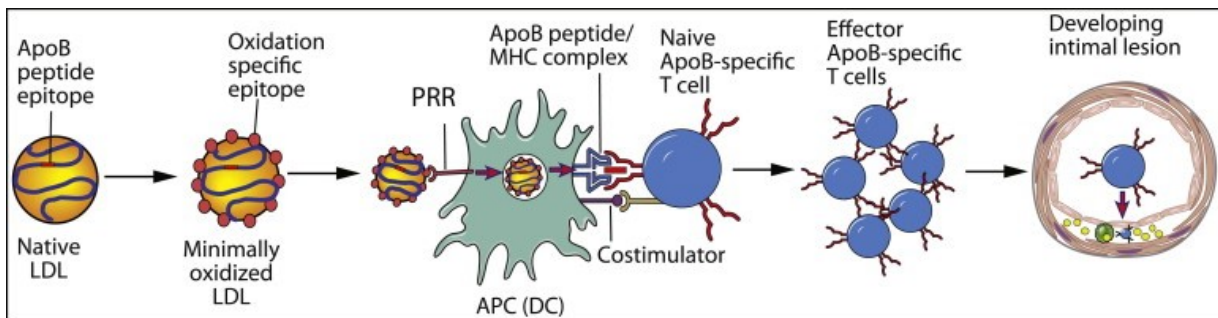


Abbildung 6 Potentielle Rolle von ApoB-Proteinen als Verstärker der Immunantwort bei Atherosklerose (20)

7.3.2 B-Zell-Linien und Funktion

B-Zellen oder B-Lymphozyten und später Plasmazellen genannt, sind durch ihre einzigartigen Oberflächen-Proteine charakterisiert, sogenannten BCRs, ebenso wie durch Antikörper, die als Proteine die gleiche Form und Antigen-Bindung besitzen und somit beide als Immunglobuline bezeichnet werden können. BCRs werden durch multigenetische Loci codiert und somatisch rekombiniert. Sie geben dadurch jedem B-Zell-Klon eine unterschiedliche Spezifität (63). Die aus hämatopoetischen Stammzellen entwickelte B-Zell-Population lässt sich in zwei Zelllinien einteilen: B-1-Zellen und B-2-Zellen.

B-2-Zellen sind die dominante Form in der erwachsenen Milz, Lymphknoten und Lymphfollikeln (57). B-2-Zellen werden durch hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark kontinuierlich ersetzt und zirkulieren im Blut, haben jedoch nur eine kurze Halbwertszeit von ein paar Tagen. B-2-Zellen tragen zur T-Zell-abhängigen humoralen und adaptiven Immunantwort bei, die zwar hochspezifisch aber verzögert ist (64). Eine kleinere

Population an B-Zellen sind B-1-Zellen. Sie sind weniger im Blut unterwegs und besiedeln vor allem die Milz und das Peritoneum bzw. die Pleura des Erwachsenen und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (64). Nur B-Zellen die in Kontakt mit Antigenen oder teils auch angeborenen Signalen kommen, werden aktiviert und verweilen im Blut. Sie mutieren in weiterer Folge zu Immunglobulin-exprimierende Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen um schneller bei erneuter Antigenexposition zu reagieren. Beide Zellarten werden vor allem in der Milz und im Knochenmark gefunden was die Existenz von Plasmazell-Nischen nahelegt, die einen schnellen Zugang in den Blutkreislauf ermöglichen (65). Im Falle von chronischen Erkrankungen, wie der Atherosklerose, bilden sich zusätzlich tertiäre Lymphfollikel in der Nähe des betroffenen Gewebes. So wurden in atherosklerotischen Plaques die Existenz von sogenannten ATLOs nachgewiesen, die vermutlich eine weit wichtigere Rolle spielen als bisher vermutet, und den Fokus der Forschung weg von den Endothelzellen hin zu der Adventitia betroffener Gefäße richtet (55, 66). Es ist wahrscheinlich, dass tertiäre lymphoide Follikel, B-Zellen bzw. B-Zell-Untergruppen mit relevanten Antigen-Spezifitäten akkumulieren (67). ATLOs wurden jedoch bisher nur in der Aorta beschrieben. Ob solche Lymphorgane auch an kleineren sklerotischen Gefäßen zu finden sind bleibt abzuwarten. Ebenso wie der Zusammenhang zwischen diesen Lymphfollikeln und der gesamt-Erhöhung an Plasmazellen und Antikörpern im Serum.

Die Immunantwort von B-Zellen wird von verschiedenen Untergruppen aufgeteilt. Eine grobe Einteilung ist die T-Zell-abhängige und die T-Zell-unabhängige Immunantwort (68). B-1-Zellen produzieren natürliche Antikörper (hauptsächlich IgM), die unabhängig von Antigen-Exposition bzw. T-Zell-Exposition existieren und eine first line defence des gesunden Menschen darstellen. Sie zeigen oft eine Autoreaktivität, indem sie an Zell-Veränderungen wie Oxidierungen oder Konformationsänderungen an Oberflächen-Strukturen oder intrazellulären Strukturen wie Einzelstrang-DNA binden (56). T-Zell-Abhängige Antworten sind vor allem bei Follikulären B-2-Zellen beschrieben. Diese sind langsamer und sind abhängig von der Präsentation des Antigens zusammen mit Immunglobulinen oder Komplementproteinen auf der Oberfläche angeborener Immunzellen (65). Sie migrieren

meist zusammen mit den T-Zellen in den Follikel, proliferieren dort und entwickeln ihre Affinität zu IgG, IgA oder IgE Antikörpern (65).

7.3.3 B-Zellen und Atherosklerose

Eine immer größere Zahl an Studien (vor allem an Apo-E-Mäusen) hat in den letzten Jahren die Rolle von B-Zellen bei der Modulation der Atherosklerose untermauert (20). Caligiuri et. al. waren die ersten, die eine beschleunigte Atherosklerose bei splenektomierten Mäusen nachweisen konnten (69). Diese Ergebnisse wurden von Major et. al. bestätigt, die bei B-Zell-defizienten Mäusen eine erhöhte Atherosklerose-Rate nachwies und diesen Zellen eine protektive Rolle zuschrieb (70). Ait-Oufella et. al. hingegen wiesen eine verlangsamte Atherogenese bei B-Zell-depletierten Mäusen nach (71). Nachfolgende Studien von Kyaw et. al. lassen eine atherogenetische Rolle von B2-Zellen vermuten (72). Es besteht die Theorie, dass dieser Effekt Antikörper-unabhängig ist und auf Mechanismen zurückzuführen sind die eine erhöhte Zytokin-Ausschüttung bedingen (73).

B-Zellen und die Immunglobuline die sie produzieren, fördern die Pathologien verschiedener chronischer Autoimmunkrankheiten wie RA oder SLE (74). PatientInnen mit diesen Autoimmunkrankheiten weisen interessanterweise erhöhte KHK-Risikowerte auf hauptsächlich als Komplikation der Atherosklerose (75). Der unabhängige Zusammenhang von klassischen Framingham Risikofaktoren mit beschleunigter Atherosklerose-Bildung bei PatientInnen mit SLE und RA, legt die Vermutung nahe, dass das Fortschreiten der Atherosklerose bei diesen PatientInnen ein Resultat erhöhter Entzündung und veränderter Immunantwort, wie zum Beispiel der Antikörperproduktion – ist (65, 76).

Man kann daraus den Schluss ziehen, dass die verschiedenen B-Zell-Untergruppen unterschiedliche modulierende Effekte auf den Prozess der Atherosklerose haben, die je nach Lokalisation, Fortschritt sowie vielen anderen Faktoren die Dynamik der Atherosklerose beeinflussen. Dieses "Doppelschneidige Schwert" (20) der einerseits atheroprotektiven, andererseits atherogenetischen Rolle von B-Zell-Subpopulationen ist auch in den kürzlich entdeckten ATLOs von Bedeutung (55) und Inhalt gegenwärtiger Forschung. Einige Theorien über die Pathophysiologie sind jedoch distanziert zu betrachten. So ist zum Beispiel eine

Klassifikation der B-Zell Untereinheiten bei Mäusen klarer als bei Menschen. Da bei der Zucht von Mäusen eine weitaus größere genetische Homogenität erreicht werden kann als es beim Menschen jemals möglich wäre. Eine genaue Aussage über die Pathophysiologie des Immunsystems im Zusammenhang mit Atherosklerotischen Veränderungen sind noch nicht zu machen. In diesem Zusammenhang ist die „hygiene Hypothese“ zu nennen: Mikrobiome in sterilen Umgebungen sorgen für eine Veränderung des Immunsystems (77). Somit ist ein Rückschluss von Labor-Messungen von Mäusen nur noch bedingt möglich.

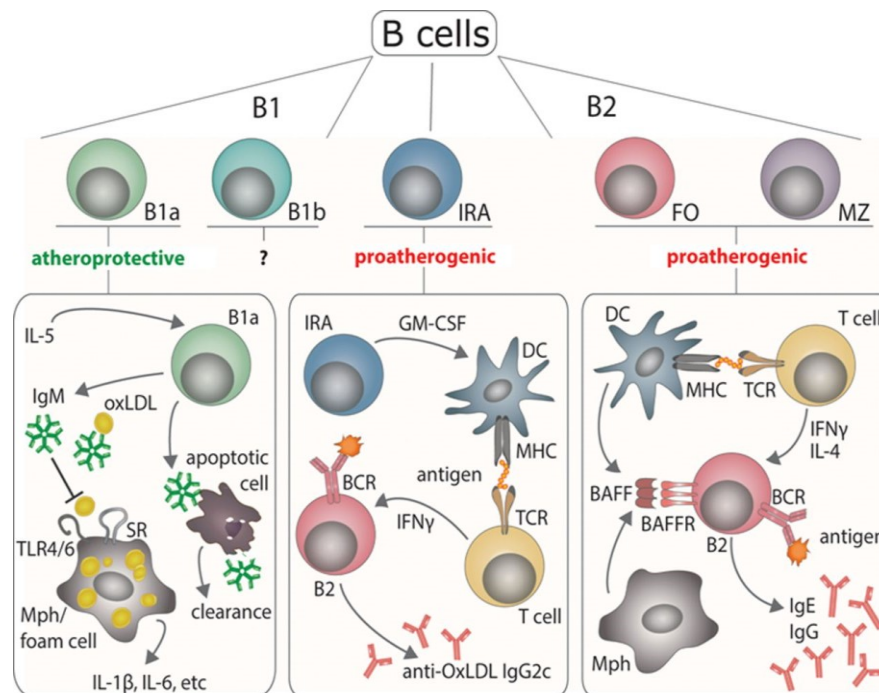


Abbildung 7 Rolle von B Zellen in Athersklerotischen Plaques. Es zeigt die Aufteilung in pro-atherogene (B2) Zellen und atheroprotective (B1) Zellen. B1-Zellen werden durch IL-5 zur Produktion von IgM angeregt, dass an oxLDL bindet und die Aufnahme durch Makrophagen ermöglicht. B2-Zellen werden von dendritischen Zellen und T-Zellen über IL4, IFN γ und BAFFs aktiviert und Zytokine ausschütten. Die Rolle von IgG als Modulator bei Atherosklerose ist noch nicht abschliessend geklärt. (60)

7.3.4 Immunglobuline

Immunglobuline sind heterodimere Proteine, die alle dieselbe Struktur besitzen: 2 Schwereketten und 2 Leichtketten die zu einer Y-förmigen Struktur zusammengesetzt werden.

Sie können funktionell in variable Domänen (die an Antigene binden) und konstante Domänen (die genaue Effektor-Funktionen haben, wie die Komplementaktivierung) aufgeteilt werden. Die variablen Domänen werden durch eine Serie an äußerst komplexen Gen-Neuanordnungen und somatischen Hypermutationen nach Antigenkontakt erschaffen. Jede variable Domäne kann in 3 Regionen eingeteilt werden (CDRs), die unglaublich vielfältig sein können und die extreme Passgenauigkeit an das Antigen ausmachen. Die 3 CDRs der schweren Kette sind mit den 3 CDRs der Leichtkette gepaart und formen die Antigen-Bindungsstelle des Immunglobulins. Die schweren Ketten besitzen 5 Klassen an Konstanten Domänen, die letztendlich Ihre Beschreibung ausmachen: IgA, IgM, IgG, IgE und IgD.

In der aktuellen Literatur wurden verschiedene Immunglobuline bereits in Assoziation mit Atherosklerose beschrieben. Unter anderem Antiendotheliale Antikörper (AECA) (78), IgE (79) und vor allem Anti ox-LDL (80) (81, 82). Es wurden auch anti-Neu5Gc Antikörper im Zusammenhang mit Atherosklerose beschrieben (83).

7.4 Diabetes und Atherosklerose

Als Diabetes wird die Gruppe an Pathologien bezeichnet, die entweder durch eine unzureichende Produktion von Insulin oder durch das fehlende Ansprechen der Zellen auf Insulin gekennzeichnet sind und schlussendlich zu einer chronischen Hyperglykämie führen (84). Diabetes wird typischerweise klassifiziert als: Typ 1, gekennzeichnet durch absoluten Insulinmangel. Typ 2, gekennzeichnet durch eine Insulinresistenz und relativen Insulinmangel, der ca. 90% aller Diabeteserkrankungen betrifft(84). Aufgrund der höheren Morbidität und Mortalität sowie der zunehmenden epidemiologischen Bedeutung des Diabetes Typ 2 galt der Fokus dieser Arbeit ausschließlich dieser Erkrankung.

Diabetes ist eine der meist verbreiteten chronischen Krankheiten der Welt, die 2010 ca. 285 Millionen Menschen betraf (85). Die steigende Prävalenz von Diabetes Typ 2 ist vor allem bedingt durch ein ansteigendes Populationsalter und Übergewicht, und es wird geschätzt, dass bis zum Jahr 2035 mehr als 592 Millionen Menschen weltweit davon betroffen sein werden (5).

Die diabetischen Spätkomplikationen gliedern sich in makrovaskuläre Komplikationen, die als Hauptursache für Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit Diabetes beschrieben werden, und mikrovaskuläre Komplikationen, wie Retinopathien, Nephropathien und Neuropathien (86). Vor allem unter Typ-2-DiabetikerInnen gilt die Assoziation mit vaskulären Ereignissen als gefestigt und ist heute ein fester Bestandteil multifaktorieller therapeutischer Intervention bei Atherosklerose-PatientInnen (3, 87).

7.4.1 Epidemiologie

Die Klinische Manifestation der Atherosklerose ereignet sich hauptsächlich in drei Gefäßgebieten: Herzkranzgefäße, untere Extremitäten, und extrakranielle Karotiden. Sie ist in allen drei mit Diabetes assoziiert, so sterben bis zu 50% aller DiabetikerInnen an einer Kardiovaskulären Krankheit (88).

7.4.1.1 Koronare Herzkrankheiten

PatientInnen mit Diabetes Typ 2 haben ein 2-4-fach erhöhtes Risiko an einer Koronaren Herzkrankheit zu erkranken (89). Ebenso verschlechtert Diabetes die Prognose bei akutem Koronarsyndrom. Bei instabiler Angina wurden in verschiedenen Studien, im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Diabetes, eine erhöhte Mortalität, Komplikationsrate und Reinfarzierung festgestellt (90, 91).

7.4.1.2 Periphere Arterielle Verschlusskrankheiten

Die Wahrscheinlichkeit für DiabetikerInnen an einer PAVK zu leiden ist ebenfalls 2 bis 4 Mal höher (92). Die Diabetesdauer korreliert mit der Inzidenz und dem Ausmaß der Verschlusskrankheit und verändert meist den Verlauf der PAVK, da z.B. DiabetespatientInnen öfter an einer infrapoplitealen Verkalkung der Arterien leiden als nicht-DiabetikerInnen (93). PatientInnen mit Diabetes entwickeln auch öfter eine symptomatische Form der PAVK, die sogenannte Claudicatio Intermittens, und müssen sich öfter einer Amputation der betroffenen Extremität unterziehen (94).

7.4.1.3 Zerebrovaskuläre Erkrankungen

Ebenso wie für die Entwicklung der koronaren und peripheren Gefäße ist Diabetes ein Risikofaktor für die Gefäß-Kalzifizierung der zentralnervösen Gefäßstrombahn, da es auch bei

diesen PatientInnen zu einer erhöhte Inzidenz von extrakraniellen Karotis-Atheromata führt (95) und eine bis zu 5 Mal höhere Prävalenz für kalzifizierte Karotiden aufweisen (96).

Das Risiko einer zerebralen Ischämie ist bei Diabetes PatientInnen bis zu 400% höher (97) und tritt im Schnitt 3 Jahre früher auf als bei Nicht-DiabetikerInnen (98). Letztendlich bedingt ein dauerhaft erhöhter Glucosespiegel die gesamt- wie auch die infarktverbundene Sterblichkeitsrate erheblich (98, 99).

7.4.2 Pathologische Mechanismen diabetischer Vaskulopathien

Der ungewöhnliche metabolische Zustand des Diabetes ebnet den Weg zu einer arteriellen Dysfunktion. Die entscheidenden Faktoren die eine Zelluläre Entgleisung bedingen sind vor allem die chronische Hyperglykämie, die Dislipidämie und die Insulinresistenz, die wiederum mit weiteren Risikofaktoren wie arteriellem Hypertonus und Hyperkoagulabilität einhergeht. Diese Faktoren schaffen eine noch höhere Anfälligkeit der Arterien für atherosklerotische Veränderungen, und verschlechtern zudem den Zustand aller beteiligten Zellen und deren Funktionen, was letztendlich zu einer noch schnelleren Progression der Atherosklerose führt.

7.4.2.1 Endothelzellen

Ein erhöhter Plasma-Glukose-Wert beeinträchtigt die NO-abhängige Vasodilatation durch eine Reihe an Mechanismen die zu einer verminderten Verfügbarkeit von NO in den Endothelzellen führt (100). Eine chronische Hyperglykämie inhibiert die eNOS-Synthetase-Aktivierung in der Endothel- und glatten Muskelzellen durch die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies(101). Vor allem das Superoxidanion (O_2^-) führt zur Entstehung von kurzlebigen Peroxinitrit ($ONOO^-$) welches die Oxidierung des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin und schließlich die Inaktivierung der eNOS vorantreibt (102). Es wird weiterhin vermutet, dass Peroxinitrit die Synthese von Prostacyclinen in den Endothelzellen vermindert, den stärksten endogenen Thrombozytenaggregationshemmern des Menschen (103). Die eNOS-Aktivität ist auch durch andere Faktoren des Diabetes Typ 2 beeinträchtigt. Insulinresistenz steigert die Freisetzung freier Fettsäuren aus adipösem Gewebe was wiederum zu einer Aktivierung von Proteinkinase C, zu einer Beschränkung von Phosphoinositid-3-Kinasen und zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

führt und die Verfügbarkeit von NO drastisch weiter absenkt (104, 105) . Proteinkinase C ist ein Promotor der Proliferation von extrazellulärer Matrix und verschiedener Zytokinen (106) während PI-3-Kinasen in Endothelzellen als eNOS Agonisten eine Rolle spielen (107). Dieser oxidative Stress erhöht letztendlich die Aktivierung von NFκB (Vgl. Kapitel 7.2.4).

Zusätzlich zu der Einleitung und Förderung von Atherogenese begünstigt die chronische Hyperglykämie außerdem die spätere Plaque-Instabilität und dessen Folgekrankheiten. Diabetische Endothelzellen emittieren Zytokine die eine Synthese von Kollagen durch glatte Muskelzellen vermindern (108). Die Vermehrung von MMP's ist außerdem ausreichend gesichert (109) was in weiterer Folge zu Kollagenabnahme in der Extrazellulären Matrix führt und die mechanische Stabilität eines Plaques beeinträchtigt.

7.4.2.2 Glatte Muskelzellen

Die Atherogenität glatter Muskelzellen steigt ebenfalls durch einen zu hohen Plasmaglukosewert. Einer der wichtigen Angriffspunkte der Atherosklerose ist die vasomotorische Funktion. PatientInnen mit Diabetes Typ 2 besitzen einer verminderte NO-assoziierte Vasodilatation, was letztendlich auf die gestörte Zellfunktion glatter Muskelzellen zurückzuführen sein kann (100). Die Erhöhung von vasokonstriktiven Mediatoren wie vor allem von Endothelin-1 ist ein weiterer wichtiger atherogenetischer Prozess, der durch eine Insulin-vermittelte erhöhte Genexpression vermittelt oder durch eine vermehrte Stimulierung von "advanced glycation end products"(AGES) Rezeptoren sein könnte (110).

Atherogenetische Mechanismen wie die Aktivierung von PKC und NFκB sind genauso betroffen wie in Endothelzellen, und führen auch hier zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (105). Des Weiteren wurde eine beschleunigte Ansammlung und Wanderung glatter Muskelzellen bei DiabetikerInnen in atherosklerotischen Läsionen festgestellt (111). Ebenso könnte eine hyperglykämische LDL-Veränderung die erhöhte Migration und Apoptose glatter Muskelzellen zur Folge haben (86).

7.4.2.3 Hämostase

Bei DiabetespatientInnen ist die komplette Hämostase beeinträchtigt (112). Anomalien in der Thrombozytenfunktion können das Voranschreiten der Atherosklerose verschlimmern und

schließlich zu einer Plaque-Ruptur führen. Da Thrombozyten einen Insulin-unabhängigen Glukosetransport besitzen, ist deshalb ein erhöhter Glukosespiegel im Plasma mit dem in den Thrombozyten gleichzusetzten (112). Intrazellulär führt das zu einer Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), zu einer Verminderung von Thrombozyten-abhängigem NO und zu erhöhten Produktion von Superoxid-Anionen (113).

Ebenfalls zeigen DiabetespatientInnen eine Störung im Kalzium-Haushalt (114). Diese gestörte Regulation kann zu einer Fehlfunktion der Thrombozyten führen, da Zytosolisches Kalzium die Thrombozyten-Form, -Aggregation und Thromboxan-Bildung bestimmt (115). Zusätzlich weisen DiabetikerInnen einer erhöhte Oberflächenexpression von Glykoprotein Ib (GpIb) auf, das die Von-Willebrand-Faktor-Anbindung, die GpIIb/IIIa und schließlich die Thrombozyten-Fibrin-Interaktion stark beeinflusst (112) und zu einer schnelleren und früheren Thrombus-Bildung führt.

Zusammengefasst haben chronisch hyperglykämische PatientInnen eine höhere intrinsische Aktivierung und eine reduzierte Hemmung der Thrombozyten, was das potentiell erhöhte Thrombotische Potential von DiabetespatientInnen erklärt (86).

Zusätzlich sind auch Beeinträchtigungen der Plasmatischen Hämostase beeinflusst, die durch erhöhte Serumkonzentrationen von Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) (116), Gewebefaktoren und Faktor VII, sowie durch erniedrigte Werte von Antithrombin III und Protein C beeinflusst werden (117, 118).

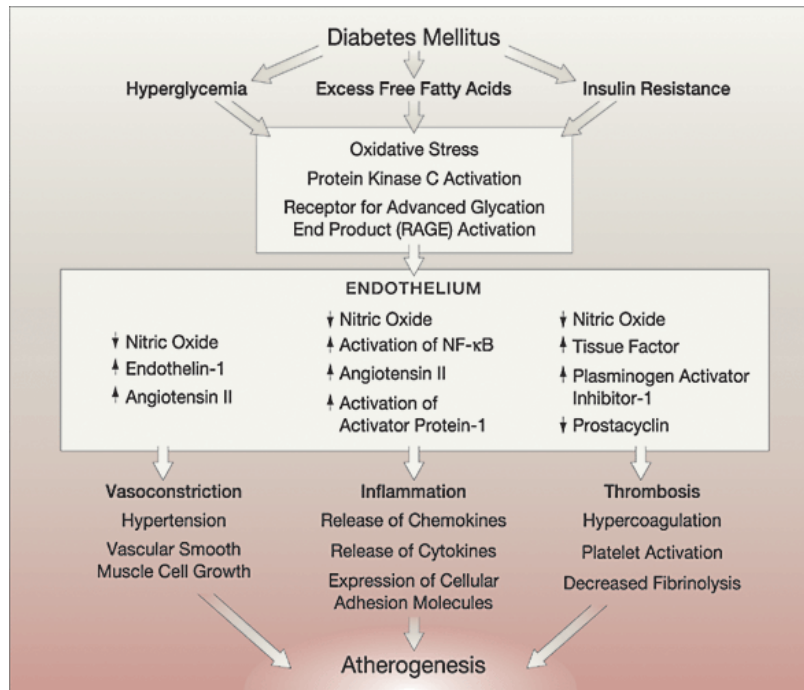


Abbildung 8 Auswirkung der chronischen Hyperglykämie auf die Atherogenese (86)

7.5 Diagnostische Parameter

Es gibt eine Reihe an diagnostischen Möglichkeiten um asymptomatische und symptomatische Atherosklerose zu quantifizieren. Die Entwicklung nicht-invasiver Bildgebung hat zu großen Veränderungen in der Forschung geführt da sie zum ersten mal ermöglichte asymptomatische PatientInnen zu studieren und somit den Forschern ermöglicht sich auf präklinische Krankheiten zu fokussieren, ohne die Komplikationen und Probleme zu begegnen die mit symptomatischen PatientInnen auftreten. Neben der Koronarangiographie, dem Intravaskulären Ultraschall, der Computertomographischen Angiographie und der Magnetresonanz haben sich in den letzten Jahren vor allem die Doppler-Ultraschall-Methode und die B-Mode Ultraschall-Methode in Guidelines für Klinik und Forschung etabliert.

7.5.1 Karotis-Intima-Media-Dicke und Plaque-Aumaß

Die Bestimmung der Intima-Media-Dicke der beiden Karotiden mittels B-Mode Ultraschall ist eine sehr gute Methode zur Bestimmung des Plaque-Ausmaßes und zur Erkennung von

subklinischen kardiovaskulären Krankheiten (119-123). Die Intima-Media-Dicke ist das Korrelat der Messungen von Verbindung zwischen Lumen und Intima sowie der Verbindung zwischen Media und Adventitia von Arterienwänden. Die cIMT wird mittels standardisierter Ultraschall Messung der Karotiden 1cm proximal des Bulbus caroticus bestimmt (124, 125). Kardiovaskuläre Ereignisse hängen eng mit der Progression der Atherosklerose in Karotiden zusammen (126).

Es gibt mehrere Vorteile der Messung der cIMT als Prognostikum. Die Messung ist nicht-invasiv, billig, sofort anwendbar und sie birgt keinerlei Gefahr für die Probanden. Deshalb ist die cIMT in den letzten Jahrzehnten ein weit verbreiteter Parameter für das Fortschreiten von kardiovaskulären Krankheiten in klinischen Studien geworden. Es sind mittlerweile große Mengen an Daten über die Verteilung der cIMT in der Bevölkerung für Männer und Frauen zwischen 25 und 85 Jahren bekannt (127). Demnach werden cIMT-Messungen >1.20 mm als nicht mehr normal angesehen, während das Fortschreiten der Atherosklerose auf 0.02 bis 0.05 mm pro Jahr geschätzt wird (128). Obwohl gängige Guidelines widersprüchliche Empfehlungen abgeben was den Nutzen der Bildgebung asymptomatischer Atherosklerose betrifft, spricht sich die Mehrheit der Guidelines für die Benutzung der Karotis IMT- und Plaque-Messung mittels Ultraschall aus (129).

Die Messung des Plaque Ausmaßes (Plaque Burden) ist eine weitere sehr gute Quantifizierungsmethode von Atherosklerose, mit teils größerer prognostische Aussagekraft hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse. Hier zeigte die groß angelegte Tromsø-Studie, dass die gesamte Plaque-Fläche (total plaque area TPA) einen weitaus stärkeren Voraussagewert bei Myokardinfarkten und Apoplexie als die cIMT hat (130) was durch eine später durchgeführte Metaanalyse bestätigt werden konnte (131).

7.5.2 C-reaktives Protein

Plasma C-Reaktives Protein (CRP) ist ein unspezifisches Akut-Phase-Protein das leicht zu messen ist. Es ist ein gut beschriebener Marker der angeborenen Immunität und ist weit verbreitet in der klinischen Diagnostik akuter und chronischer Entzündungen. Es wird diskutiert ob die Messung von CRP-Werten einen prädiktiven Wert für kardiovaskuläre

Ereignisse hat. Ridker und Libby sehen in der Messung von hoch-sensitivem CRP (hsCRP) im Plasma einen sehr guten Messpartner im Zusammenhang mit Plasmalipiden und anderen Framingham-basierten Kriterien da IL-6 zwar in der Kausalitätskette der Atherosklerose vorkommt, jedoch schwer zu analysieren ist (132); hsCRP ist hingegen nicht kausal, jedoch sehr gut zu messen und hat sich als guter Marker für das frühe Staging und den Fortschritt der Karotis-Atherosklerose herausgestellt (133) und korreliert stark mit immunhistochemischen Färbungs-Intensitäten fibröser Plaques und demakutem Koronarsyndrom (134). Erhöhte hsCRP-Level treten weiterhin auf bei PatientInnen mit Diabetes Typ 1 oder adipösen PatientInnen, sowie bei diesen PatientInnen auch ein Zusammenhang mit der cIMT-Progression der Karotiden vermutet wird (135, 136).

7.5.3 Polyklonale Freie Serum-Leichtketten

Polyklonale Serum-Immunglobulin-Leichtketten können in zwei Klassen unterteilt werden: κ -Leichtketten und λ -Leichtketten.

In Menschen herrscht eine Prävalenz des κ -Isotyps mit ca. 60%. Es ist bis heute noch keinen funktionellen Unterschied zwischen κ und λ Antikörpern bekannt, somit wird den Leichtketten nur ein Diversifizierungseffekt für Immunglobuline zugeschrieben, aber eben kein funktioneller (137).

Während der Zusammensetzung von Immunglobulinen im Endoplasmatischem Retikulum fällt ein Überschuss an Leichtketten von ca. 500mg pro Tag an. Exzessives Material wird in den Blutkreislauf abgegeben und renal ausgeschieden, was letztendlich zu einer mittleren Verweildauer von 2-6 Stunden im Blut resultiert (138).

Serum Leichtketten werden vor allem als Marker bei Monoklonalen Gammopathien eingesetzt. Dabei steigt meist eine der beiden Leichtketten-Arten an, und eine verschobene κ/λ -Ratio ist zu bemerken. Erhöhte polyklonale Serum-Leichtketten haben hingegen eine annähernd normale Ratio, was auf eine erhöhte Produktion im Rahmen von gesunden Immunantworten bei Infektionen, Entzündungen oder Autoimmunkrankheiten, auf eine verminderte renale Clearance oder auf eine Kombination beider Faktoren hindeutet (139).

Die aussagekräftigste Studie zu Referenzwerten bei Gesunden Probanden wurde von Katzmann et. al durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Normalwerte wird in Tabelle 1 gegeben.

<i>Gesundes Serum</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Median</i>	<i>95%-Referenzintervall</i>
κ -FLC	8.4 mg/L	7.3 mg/L	3.3-19.4
λ -FLC	13.4 mg/L	12.7 mg/L	5.7-26.3
κ/λ Ratio	0.63	0.59	0.3-1.65

Tabelle 2 Mittelwert/Median der Werte für die Konzentration freie Serum Leichtketten bei 282 PatientInnen
(140)

Katzmann et al. beobachteten, dass κ -FLC Konzentrationen generell niedriger sind als λ , was zu einem Median der Ratio von 0.59 führt. Der Grund dafür ist die Balance aus Produktion und Elimination. Es befinden sich im Serum ca. doppelt so viele κ -produzierende Zellen als λ -produzierende. Da aber κ -Moleküle monomerisch mit ca. 25 kDa sind und λ -Moleküle Dimerisch mit 50 kDa ist deren renale Clearance schneller und ihre Serum-Halbwertszeit kürzer bei gesunden Individuen (140). Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (141, 142).

7.5.3.1 FLC und Nierenfunktion

Bei zunehmender Niereninsuffizienz ändern sich die Mechanismen der FLC-Clearance. Bei verminderter GFR, nimmt die Clearance ab und die Elimination findet über das Retikulo-Endotheliale-System statt, das keine Präferenz für eines der Moleküle zeigt (143). Somit nähern sich bei sinkender GFR die Konzentrationen der beiden Leichtketten an und deren Präsenz ist mehr ihrer Produktion als der Elimination geschuldet. Als Folge verändert sich bei einer geringen Zahl an PatientInnen die κ/λ -Ratio bei polyklonaler Produktion auf einen Wert >1 (144).

7.5.3.2 FLC und Kardiovaskuläre Krankheiten

Für Bestimmungen von nicht-klonalen Leichtketten, wie bei Kardiovaskulären Erkrankungen, spielt vor allem die Summe der freien Leichtketten (Σ FLC oder cFLC) eine Rolle. Bei PatientInnen mit akutem Herzversagen zeigte sich eine deutlich höhere Mortalität mit Werten meist in den oberen Quartilen (145, 146). Insgesamt ist eine Erhöhung der Σ FLC ein signifikanter Prädiktor der Gesamtsterblichkeit in der Bevölkerung ohne Plasmazellstörungen (139).

7.5.3.3 FLC und Diabetes

Schon seit vielen Jahrzehnten wird die FLC/Albumin-Ratio bei DM1-PatientInnen als früher Indikator der diabetischen Nephropathie genutzt (147). Die Tatsache, dass dabei die Serum-Werte annähernd normal blieben impliziert die renale Ursache der erhöhten FLC Ausscheidung und nicht die erhöhte Produktion (148). In neueren Studien wurden bei PatientInnen mit DM2 und Übergewicht höhere Werte im Urin im Vergleich zu nicht-adipösen DM2 PatientInnen gefunden (149).

Bei Studien an Konzentrationen im Serum und Urin von DM2-PatientInnen um den Nutzen für die Früherkennung diabetischer Nephropathien abzuschätzen hatten PatientInnen schon erhöhte cFLC-Werte in Urin und Serum vor der Entwicklung einer renalen Dysfunktion (144). Dabei hatten Süd-Ost-Asiatische PatientInnen einen global höheren Serum FLC-Wert als Kaukasische bei insgesamt normaler eGFR, eine Beobachtung die auf eine höhere Produktion und Entzündungsrate zurückgeführt werden kann (144).

In einer weiteren Studie an derselben DM2-Population innerhalb eines 2-Jahres Follow up wurden höhere cFLC-Werte bei PatientInnen mit einem Kardiovaskulären Event festgestellt. Nach multivariaten Analysen blieb ein Serum-Wert >57.2 mg/L signifikant mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse verbunden (150) sogar nach Korrektur für Alter, Behandlung, Diabetesdauer und Albumin-Kreatinin-Ratio.

8 Methoden

8.1 PatientInnen

Diese Arbeit ist Teil der CARDIONOR Studie (Treatment of *CARDIO*vascular Risk in Patients with Diabetes Mellitus Type-2: Identification of Treatment *NOn*-Responders) dabei wurden 97 PatientInnen mit bekanntem Diabetes Typ 2, bei denen keine Herz-Kreislauf-Vorerkrankungen bekannt waren, an der Diabetesambulanz der klinischen Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel des Universitätsklinikums Graz zwischen den Jahren 2008 und 2010 rekrutiert und anschliessend einer intensivierten, multifaktoriellen Therapie unterzogen.

Es wurden PatientInnen im Alter zwischen 45 und 75 Jahre mit diagnostiziertem Diabetes Mellitus Typ 2 und mindestens zwei der folgenden Merkmale in die Studie eingeschlossen: LDL-Cholesterin > 120 mg/dl, Blutdruck > 140/90 mmHg, HbA1c > 7,5%. Bei den Messgrößen kam es nicht auf der Behandlungsgeschichte der PatientInnen an.

Diabetes Mellitus Typ 2 wurde nach den WHO Kriterien (WHO/IDF 2006) definiert.

PatientInnen mit einer Vorgeschichte an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Herzinsuffizienz (> NYHA II), Serum-Kreatinin > 265,2 μ mol/L, Aspartat-Aminotransferase/Alanin-Aminotransferase > 3x über der Höchstgrenze des Referenzbereichs und schwerwiegenden psychiatrischen Erkrankungen wurden ausgeschlossen.

Die Studie wurde nach den Richtlinie der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Erhebung der Daten und alle weiteren Vorgehensweisen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz bewilligt (27-148 ex 14/15). Außerdem wurde eine schriftliche Einverständniserklärung von allen PatientInnen unterzeichnet und alle PatientInnen wurden mit einer fortlaufenden Nummer codiert (pseudonymisiert). Die gesammelten Daten wurden ausschliesslich mit dieser PatientInnen-ID versehen in einem SPSS-Datenblatt gespeichert und anschließend ausgewertet. Nur autorisierte Personen haben Zugriff auf den Datensatz.

8.2 Studiendesign

Die Studie wurde als eine offene, prospektive, monozentrische Studie über einen Zeitraum von 2 Jahren durchgeführt. Zu drei Zeitpunkten (Baseline, nach 3 Monaten und nach 2 Jahren) wurden in der Diabetesambulanz am Universitätsklinikum Graz ausführliche Studienvisiten durchgeführt. Diese Studienvisite inkludierte eine Nüchtern-Blutabnahme, die Messung der Karotis-Intima-Media Dicke und einen oralen Glukosetoleranztest.

Eine Übersicht über den detaillierten Studienablauf ist aus Abbildung 9 zu entnehmen.

8.3 Labor-Messungen

8.3.1 Serum-Leichtketten (FLC)

Freie Serum Leichtketten ($\lambda+\kappa$) wurden mittels Nephelometrie (Freelite[®], The Binding Site Group, Birmingham, UK) durch eine BN[™] II Analysesystem (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) aus gefrorenem Plasma gemessen.

8.3.2 High Sensitive C-reactive Protein (hsCRP)

Hoch sensitives C-Reaktives Protein (hsCRP) wurde mittels particle-enhanced immunoturbimetric assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) gemessen, mit einer Nachweisgrenze von 0.1mg/l.

8.4 Karotis-Intima-Media-Dicke (cIMT)

Die Messung der cIMT wurde mittels hochauflösendem, tragbarem Ultraschall Acuson Cypress (Siemens Medical Solutions USA Inc., Mountainview, California) durchgeführt. Es wurden die Arteria Carotis Communis, Sinus caroticus sowie Carotis interna und externa beider Seiten vermessen. Die cIMT wurde an der Arteria Carotis Communis in einem Segment 2 cm unterhalb des Sinus und gemessen. Die Probanden blieben über Nacht mindestens 12 Stunden nüchtern und lagen während der Messung in einem ruhigen, abgedunkelten Raum waagrecht auf dem Rücken. Die Messung wurde nach einer 15-minütigen Ruhephase durchgeführt. Die Messungen der Carotis-Wand beider Seiten wurden kombiniert um eine mittlere Dicke zu berechnen (151).

8.5 B-Score

Das Ausmaß der Atherosklerose wurde mittels Ultraschallmessung nach dem Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study Protocol bestimmt, indem die per B-Mode-Ultraschall gemessenen Plaques beider Karotiden quantifiziert und gruppiert wurden (152). Dabei entsprachen die Werte: 0= keine Veränderung der Arterienwand, 1= Wand-Dicke >1 mm, 2= Plaque < 2mm, 3= Plaque 2 – 3 mm, 4= Plaque >3mm, und 5= kompletter Verschluss des Lumens. Ein einziger B-score > 2 an einem beliebigem Messpunkt wurde als fortgeschrittener Karotis-Plaque definiert. Ein Summations-Score von > 3 mit Werten aus Arteria Carotis Communis und Arteria Carotis Interna beider Seiten wurde als fortgeschrittene Karotis-Atherosklerose festgelegt. Desweiteren wurden zu Analyse-Zwecken die Werte zu drei Kategorien zusammengefasst. Die Definition der Kategorien sind aus Tabelle 3 zu entnehmen.

B-Score Kategorien

1	Keine Veränderung und Wand-Dicke > 1mm
2	Plaque < 2 mm
3	Plaque > 2 mm und kompletten Lumen-Verschluss

Tabelle 3 Kriterien für die Kategorisierung des B-Scores in 3 Gruppen

8.6 Statistische Analyse

Für diese Arbeit wurde eine explorative Datenanalyse mittels SPSSSoftware Version 22.0 (SPSS Inc. Chicago Ill) durchgeführt. Kontinuierlichen Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei Normalverteilung und als Medianwert (Interquartilsabstand) bei nicht normaler Verteilung dargestellt. Ein p-Wert kleiner als 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Korrelationen wurden mittel Pearsons-Korrelationskoeffizienten und nicht-parametrische Korrelationen mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman-Rho) ermittelt. Varianzanalysen mittels einfaktorieller

ANOVA. Beim Vergleich der Mittelwerte wurde ein Post-Hoc-Test durchgeführt (Duncan-Test und Bonferoni-Test).

9 Ergebnisse

9.1 Baseline-Charakteristika

Von den 97 in der Studie eingeschlossenen PatientInnen waren zu Baseline von 75 PatientInnen sowohl cIMT als auch cFLC vorhanden. Nach 3 Monaten konnten diese beiden Parameter von 74 PatientInnen ausgewertet werden. Zum Zeitpunkt der dritten Visite wurde die IMT gemessen, jedoch kein Serum entnommen, somit sind für diesen Zeitpunkt keine Daten für cFLC und hsCRP vorhanden (Vgl. Abbildung 9). Die Baseline-Charakteristika sind in Tabelle 4 aufgelistet.

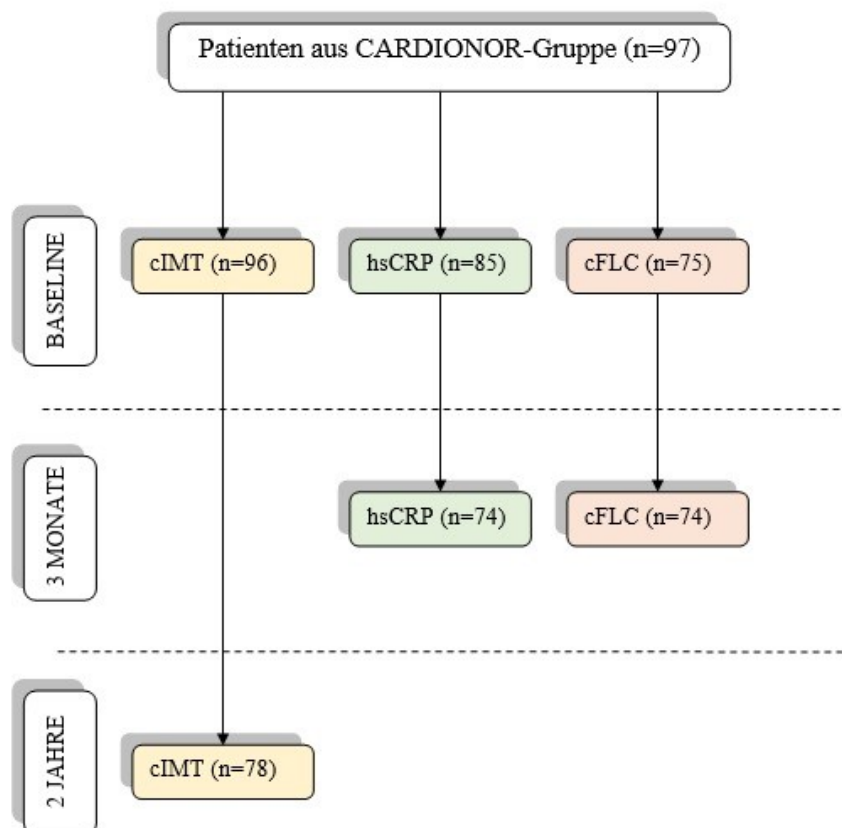


Abbildung 9 Studienübersicht

Basisdaten der Studienpopulation

Männer	49
Frauen	26
Körpergröße (cm)	170 ±9.8
Körpergewicht (Kg)	91.6 ±15.4
Alter (Jahre)	59.4 ±8
Systolischer Blutdruck (mmHg)	152 (140-164)
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	89 (82-95)
Körpergewicht (Kg)	91.7 ±15.5
BMI (Kg/m²)	31.4 (27.9-34.1)
HbA1c (%)	8.3 ±1.1
Diabetesdauer (Jahre)	8.1 ±6
Diabetes in Familie (%)	61.3
CVD in Familie (%)	34.7
Raucher (%)	28
cFLC Baseline (mg/L)	30.2 (24.9-39.5)
IMT (mm)	0.87 (0.78-0.94)
hsCRP	3.4 (2.0 -5.9)

Daten werden entweder als Prozentwerte für kategorielle, und als Mittelwert ± Standardabweichung oder Median mit 25.-75. Perzentile für kontinuierliche Variablen angegeben

Tabelle 4 Baseline-Charakteristika der Studienpopulation

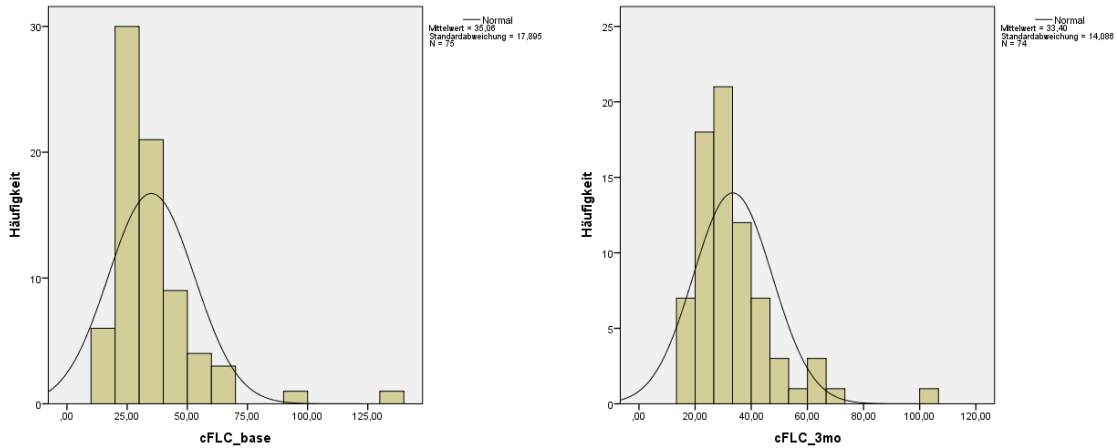


Abbildung 10 Häufigkeitsverteilung freier Leichtketten zu Baseline (links) und nach 3 Monaten (rechts)

9.2 Korrelation und Regression

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Polyklonalen Serum-Leichtketten und dem Atherosklerose-Ausmaß bei DM2-PatientInnen zu untersuchen. Hierfür wurde eine Explorative Datenanalyse der Baseline-Daten und Korrelationsanalysen sowie Regressionsanalysen der kombinierten freien Leichtketten (cFLC) und der Karotis-Atherosklerose gemessen, einerseits mittels mittlerer Carotis-Intima-Media-Dicke (cIMT), andererseits mittels B-Score.

Korrelationsanalysen kombinierter freier Serum Leichtketten (cFLC Baseline)

Variablen	Einfache Korrelationsanalyse (Spearman-Rho)		Partielle Korrelationsanalyse*	
	R-Wert	P-Wert	R-Wert	P-Wert
<i>B-Score Gesamt</i>	0.38**	0.001	0.320**	0.007
<i>cIMT</i>	0.220	0.58	0.216	0.068
<i>hsCRP</i>	0.233	0.045	0.351**	0.003
<i>Diabetesdauer</i>	0.61	0.601		
<i>packyears</i>	0.169	0.274		

*Adjustiert für Alter, Geschlecht und Nierenfunktion

** Statistisch Signifikant bei $p > 0.05$

Tabelle 5 Korrelationsanalysen cFLC Baseline

Korrelation der durchschnittlichen Intima-Media-Dicke mit FLC zu Baseline

Variablen	Einfache Korrelationsanalyse (Spearman-Rho)		Partielle Korrelationsanalyse*	
	R-Wert	P-Wert	R-Wert	P-Wert
Quotient FLC κ/λ	0.112	0.339	0.159	0.226
FLC κ	0.219	0.060	0.317**	0.013
FLC λ	0.186	0.110	0.285**	0.027
cFLC	0.190	0.103	0.191	0.143
hsCRP	0.017	0.883	0.097	0.463

*Adjustiert für Alter, eGFR und Geschlecht

** Statistisch Signifikant bei $p > 0.05$

Tabelle 6 Korrelationsanalysen cIMT Baseline

Aus Tabelle 5 ergibt sich beim B-Score Gesamt eine signifikante Korrelation mit cFLC, die auch nach Korrektur für Alter, Geschlecht und Nierenfunktion statistisch signifikant bleibt. Die Korrelation der polyklonalen Leichtketten mit hsCRP ergab eine positive signifikante Korrelation in der adjustierten Analyse.

Beim Vergleich der Mittelwerte der kombinierten freien Leichtketten (cFLC) aufgetragen je nach B-Score, zeigt sich ein Anstieg ab einem Score von 2 ($p=0.001$) (Vgl. Abbildung 11).

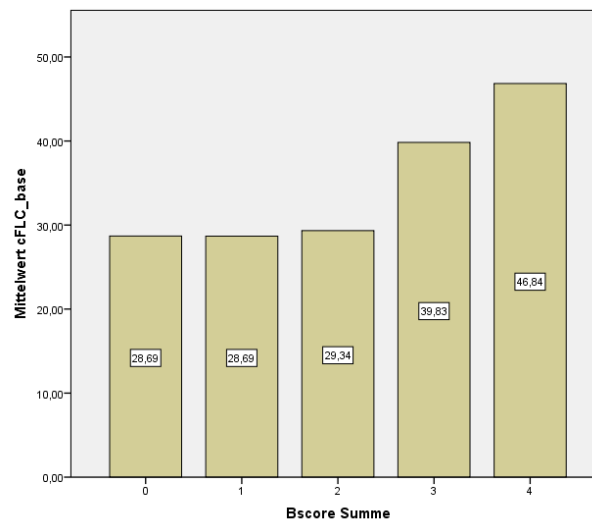


Abbildung 11 Korrelation der Mittelwerte cFLC und B-Score am Zeitpunkt Baseline

Nach Kategorisierung der Plaque Werte in 3 Gruppen (Vgl. Tabelle 6) und bei Vergleich der Kategorie 3 mit den anderen beiden, ergaben sich weiterhin signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Kategorie 1 und 3: $p=0.008$; Kategorie 2 und 3: $p=0.04$) (Vgl. Abbildung 12).

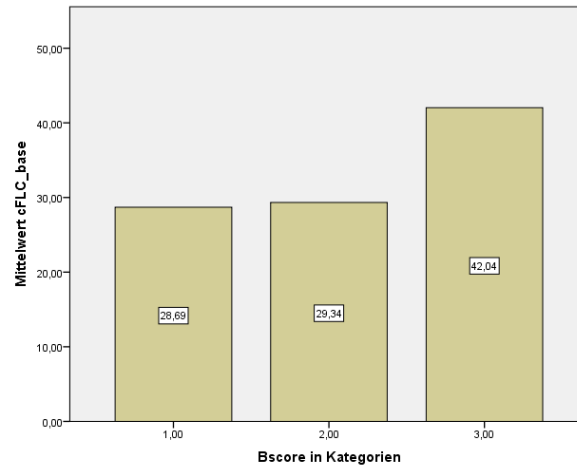


Abbildung 12 Vergleich der Mittelwerte cFLC mit dem Plaque-Ausmaß geordnet in 3 Kategorien

Bei einfacher Pearson Korrelation der mittleren Intima-Media-Dicke (cIMT) und der kombinierten freien Leichtketten (cFLC) ergibt sich eine Korrelation von $r=0.272$ bei einem Signifikanzwert von $p=0.018$.

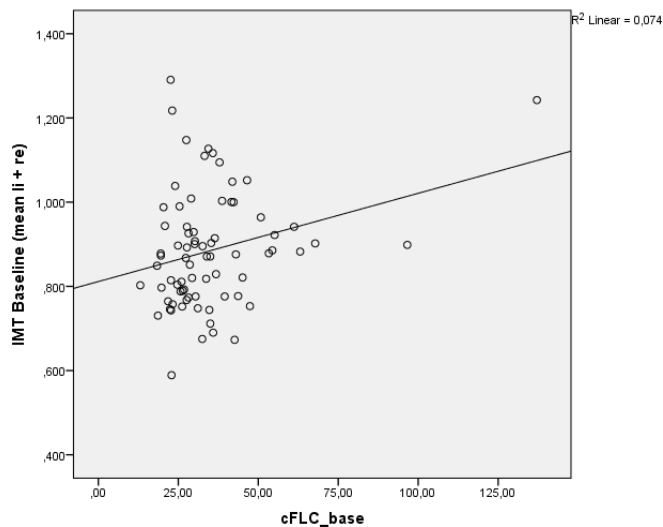


Abbildung 13 Korrelation der cIMT und cFLC Baseline nach Pearson

Die in Tabelle 4 signifikanten Korrelationen der κ -Leichtketten und der Gesamt-Leichtketten (cFLC) mit der mittleren Intima-Media-Dicke (cIMT) wurden nach Adjustierung für Alter und Geschlecht nicht bestätigt.

Bei Berechnungen der Linearen Regression der mittleren Intima-Media-Dicke (cIMT) und der kombinierten freien Leichtketten (cFLC) ergibt sich ein äusserst schwacher linearer Zusammenhang mit $R^2=0.074$ (vgl. Abb. 12). Bei Berechnung der partiellen Korrelation unter Berücksichtigung des κ/λ -Quotienten (QFLC) ergibt sich eine noch schwächere Korrelation von $r=0.251$ bei einer Signifikanz von $p=0.03$. Die Residualvarianz ist in diesem Fall auf $R^2=0.063$ gesunken.

Ein ähnliches Ergebnis entsteht auch bei der Korrelation der auf die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate adjustierten Ergebnisse. Hierbei zeigt sich ein Korrelationswert $r=0.252$ bei einer Signifikanz von $p=0.029$, mit einer Residualvarianz von $R^2=0.064$.

Beim Vergleich der Korrelationen unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens und des Geschlechts ergeben sich zwar auch signifikante Korrelationen, deren Bestimmtheitsmaße jedoch ebenfalls nur gering sind (Non-smoker, male $R^2=0.237$; Non-smoker, female $R^2=0.01$; Smoker, male $R^2=0.044$; Smoker, female $R^2=0.08$) (Vgl. Abbildung 14).

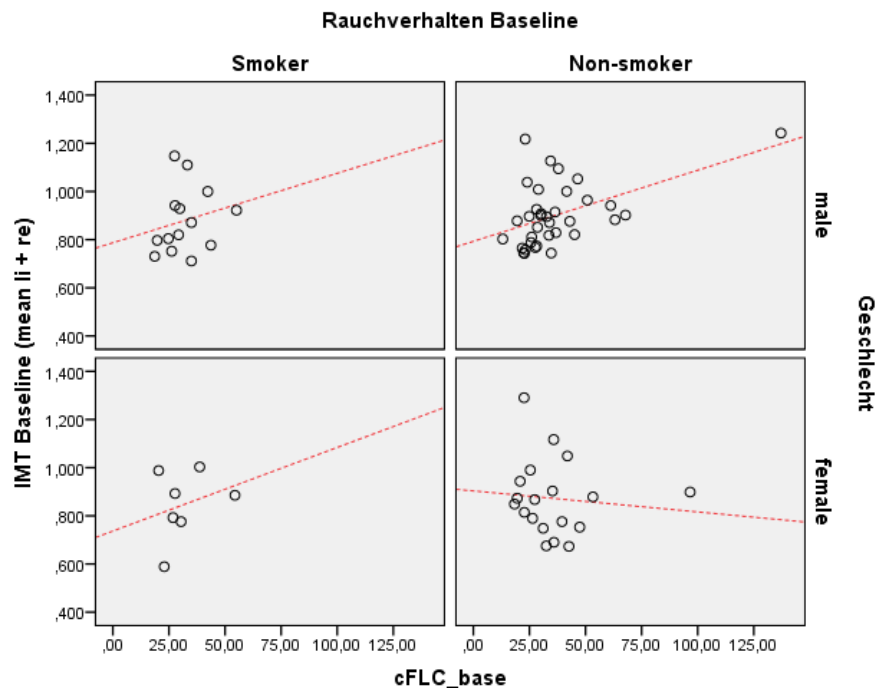


Abbildung 14 Matrix der Korrelationen cIMT und cFLC unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens und Geschlechts

Die Korrelation von eGFR und κ/λ -Quotient war invers mit einem $r=-0.119$, der jedoch nicht statistisch signifikant war ($p=0.351$).

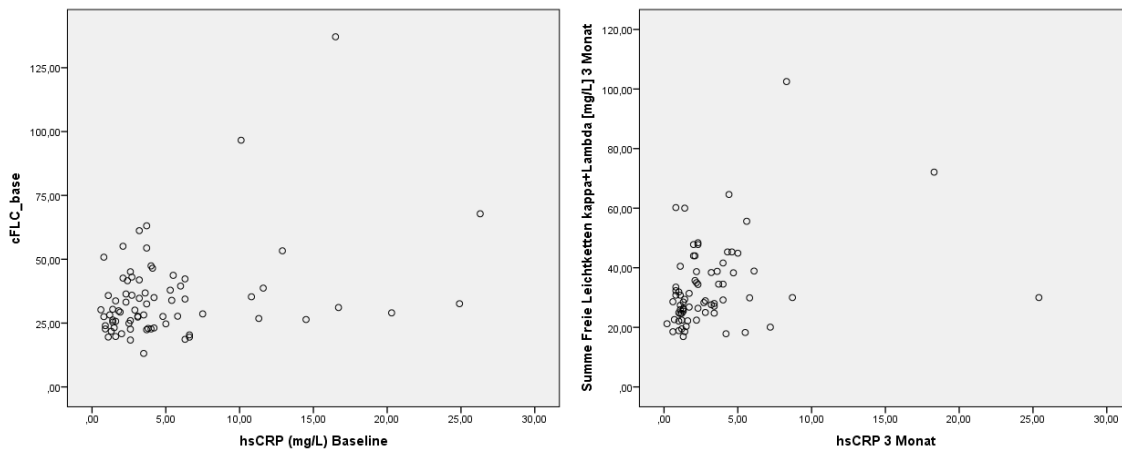


Abbildung 15 Korrelationen der beiden Entzündungsmarker cFLC und hsCRP zu Baseline (links) und nach 3 Monate (rechts)

Die Berechnungen der Korrelation der beiden Entzündungswerte zu den beiden Zeitpunkten Baseline ($r= 0.350$, $p=0.002$) und 3 Monaten ($r= 0.363$, $p= 0.001$) waren in beiden Fällen signifikant positiv (Vgl. Abbildung 15).

Die Korrelation zwischen freien Leichtketten (cFLC) und dem Langzeitblutzuckerwert (HbA1c) war zu den Zeitpunkten Baseline ($r= 0.43$; $p=0.774$) und 3 Monaten ($r= 0.134$; $p= 0.255$) nicht signifikant.

10 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Fortschritt der Atherosklerose, dargestellt durch die Carotis-Intimamediadicke (cIMT), dem Ausmaß der Atherosklerose, wiedergegeben durch den B-Score, und der Plasmakonzentration an freien polyklonalen Immunglobulin Leichtketten (FLC) bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 zu beschreiben. Weiters wurde ein Zusammenhang mit Entzündungsparametern wie dem hoch sensitiven CRP (hsCRP) angesehen. Die Arbeit wurde auf Basis zweier kürzlich zuvor veröffentlichten Studien begonnen, die jeweils zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen dem hier untersuchten Biomarker und kardiovaskulären Ereignissen bei PatientInnen mit Diabetes Typ 2 nachweisen konnten (146, 150).

10.1 Serum Leichtketten und Atherosklerose

Die Korrelation mit der cIMT ist nach der Adjustierung für Alter, Geschlecht und Nierenfunktion nicht statistisch signifikant. Der stark signifikante Anstieg der freien Leichtketten bei PatientInnen mit einem durchschnittlichen Plaque-Ausmaß $\geq 2\text{mm}$ bzw. einem Score ≥ 2 (Vgl. Abbildung 11) im Vergleich zu PatientInnen mit Plaque $< 2\text{mm}$ ist jedoch ein Indikator für einen möglichen Zusammenhang dieser zwei Parameter und ermutigt zu weiterer Nachforschung.

Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse können sich aus der Tatsache erklären, dass der B-Score, im Gegensatz zur cIMT, eher als Parameter für das Ausmaß der Atherosklerose gesehen wird. Autoren von mehreren Assoziationsstudien stellen das Plaque-Ausmaß der Atherosklerose als den besseren Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse dar (126, 153, 154).

Obwohl die Intima-Media-Messung und Plaque-Quantifizierung der extrakraniellen Karotiden mittels B-Bild-Sonographie als allgemein anerkannter Parameter für die systemische Atherosklerose gilt und ein sehr guter prognostischer Faktor für koronare Herzkrankheiten ist, muss sie natürlich weiterhin als Surrogatparameter mit all seinen Limitierungen gesehen werden. Ein Korrelat mit systemischen, nicht-spezifischen Entzündungsparametern ist deshalb immer noch mit Vorsicht zu genießen.

10.2 Serum Leichtketten und C-reaktives Protein

Burmeister et. al stellten bei der Untersuchung der Korrelation zwischen hsCRP und cFLC als Entzündungsmarker bei chronischen Krankheiten nur einen schwachen Zusammenhang fest, selbst nach Korrektur für die Nierenfunktion (155). Dies konnte, durch die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse der Korrelation zwischen beiden Markern zu den beiden Zeitpunkten, bestätigt werden (Vgl. Abbildung 15). Sie kommen ebenso wie Shantsila et. al zu dem Schluss, dass beide Marker unabhängige Informationen über den Entzündungsstatus bzw. die Immunantwort liefern und nicht als gleichwertige Marker zu betrachten sind (146, 155). Der Nutzen der Kombination beider Marker des adaptiven und des angeborenen Immunsystems

als Werkzeug für Diagnosen chronischer Entzündungen wird jedoch mit unserer Arbeit nicht beantwortet und bedarf weiterer Forschung.

10.3 Studienkohorte und Studienablauf

Ein Schwachpunkt dieser Arbeit besteht in der kleinen Studienpopulation von 75 PatientInnen bei denen alle notwendigen Parameter für diese Analyse vorhanden waren. Rezente Studien weisen eine Populationszahl zwischen 166 und 352 PatientInnen vor (146, 150). Die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse in einer größeren Kohorte wäre notwendig.

Da dies eine Datenauswertung einer vorangegangenen Studie ist (CARDIONOR), kam es zu einem weiteren limitierenden Faktor: cFLC-Werte wurden nicht prospektiv an mehreren Zeitpunkten an den PatientInnen abgenommen. Die mir zur Verfügung gestellte Datenbank beinhaltete nur Baseline Daten aller zu vergleichender Parameter (Vgl. Abbildung 9). Die Intima-Media-Dicke, ebenso wie Entzündungswerte können deshalb nicht bei den anderen Zeitpunkten nach 3 Monaten und 2 Jahren verglichen werden. Deshalb ist eine Aussage hinsichtlich der Wertigkeit dieses Parameters als Prediktor für Progredienz der Atherosklerose nicht möglich. Auch die Aussage ob eine intensivierete Behandlung der PatientInnen eventuell ein positives Outcome auf den Verlauf der Entzündungsmarker hat, ist auch nicht möglich. Follow-up Daten und eine Vergleichsgruppe wären für die Klärung der Frage sehr hilfreich gewesen.

10.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Assoziation und einen beachtenswerten Anstieg der cFLC-Plasma-Spiegeln und dem Plaque-Ausmaß, gemessen mittels B-Score. Diese Assoziation bleibt auch nach Adjustierung für Parameter wie Bluthochdruck, Rauchverhalten, Alter, Geschlecht sowie der geschätzten Nierenfunktion statistisch signifikant.

Frühere Daten haben gezeigt, dass cFLC Spiegel bei abnehmender Nierenfunktion im Plasma ansteigen. Jedoch gibt es auch Arbeiten, die nahelegen, dass die Spiegel bereits längere Zeit vor dem Auftreten der Nierenfunktionseinschränkung zu steigen beginnen (143, 144). Es ist somit unklar, in welchem Ausmaß die chronische Entzündung bei Typ 2 Diabetes -durch

Schädigung der Glomerula- zum Anstieg der freien Leichtketten im Blut beiträgt, oder inwiefern die Leichtketten selbst nephrotoxisch wirken und zu deren eigenen Anstieg im Plasma führen (156). Eine Kausalität der Korrelationen kann in dieser Studie letztendlich nicht gemacht werden.

Ebenso wurden in dieser Studie andere Entzündungs-Ursachen die ebenfalls zu einer Erhöhung an polyklonalen freien Leichtketten führen können, wie chronische Infektionen, subklinische Autoimmunkrankheiten oder Neoplasien (157, 158) nicht explizit erfragt und können somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Dispenzieri et. al hatten bereits einen Zusammenhang zwischen der cFLC-Konzentration und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Allgemeinbevölkerung festgestellt (139), was zur Spekulation führte, ob nicht zukünftig cFLC Messungen eine nützliche Früherkennungsmethode für die allgemeine Gesundheitsbeurteilung sein könnten, die nicht spezifisch für Atherosklerose oder Diabetes sein müssen. Es ist jedoch fraglich welche therapeutischen Konsequenzen sich aus dieser Erhöhung in der Allgemeinbevölkerung zu ziehen sind und ob cFLCs ein potentiell modifizierbarer Risikofaktor oder lediglich Risikomarker sind.

Auch wenn unsere Daten auf einen Zusammenhang zwischen cFLC und Karotis-Atherosklerose bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 hinweisen, so sind doch weitere Analysen mit größeren Fallzahlen notwendig, um diese Assoziation zwischen freien Leichtketten im Plasma und Atherosklerose zu bestätigen.

11 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011. ix, 164 p. p.
2. nicht übertragbare krankheiten [cited 2015]. Available from: <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00683/index.html?lang=de>.
3. Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-22.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004;27(5):1047-53.
5. Idf Diabetes Atlas G. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;109(3):461-5.
6. Almeda-Valdes P, Cuevas-Ramos D, Mehta R, Gomez-Perez FJ, Aguilar-Salinas CA. UKPDS Risk Engine, decode and diabetes PHD models for the estimation of cardiovascular risk in patients with diabetes. *Current diabetes reviews*. 2010;6(1):1-8.
7. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;87(3):293-301.
8. Kannel WB. Some lessons in cardiovascular epidemiology from Framingham. *The American journal of cardiology*. 1976;37(2):269-82.
9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(9):2045-51.
10. Navab M, Fogelman AM, Berliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, et al. Pathogenesis of atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 1995;76(9):18C-23C.
11. American Heart A. Atherosclerosis 2014. Available from: http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/WhyCholesterolMatters/Atherosclerosis_UCM_305564_Article.jsp.
12. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.
13. Dahlof B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology*. 2010;105(1 Suppl):3A-9A.
14. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American journal of pathology*. 1977;86(3):675-84.
15. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26.
16. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(5):840-56.

17. Sloop GD, Perret RS, Brahney JS, Oalman M. A description of two morphologic patterns of aortic fatty streaks, and a hypothesis of their pathogenesis. *Atherosclerosis*. 1998;141(1):153-60.
18. Caro CG. Cigarette smoking causes acute changes in arterial wall mechanics and the pattern of arterial blood flow in healthy subjects: possible insight into mechanisms of atherogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*. 1990;273:273-80.
19. Nievelstein PF, Fogelman AM, Mottino G, Frank JS. Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11(6):1795-805.
20. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 2013;38(6):1092-104.
21. Miller YI, Tsimikas S. Oxidation-specific epitopes as targets for biotheranostic applications in humans: biomarkers, molecular imaging and therapeutics. *Current opinion in lipidology*. 2013;24(5):426-37.
22. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(1):145-52.
23. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2003;14(5):421-30.
24. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(25):2379-93.
25. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(11):2292-301.
26. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews Cardiology*. 2010;7(2):77-86.
27. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(7):1506-16.
28. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(5):553-62.
29. Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P. The ins and outs of inflammatory cells in atheromata. *Cell metabolism*. 2012;15(2):135-6.
30. Kzhyshkowska J, Neyer C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology*. 2012;217(5):492-502.
31. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nature medicine*. 2013;19(9):1166-72.
32. Stephen SL, Freestone K, Dunn S, Twigg MW, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, et al. Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *International journal of hypertension*. 2010;2010:646929.

33. Kellner-Weibel G, Yancey PG, Jerome WG, Walser T, Mason RP, Phillips MC, et al. Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(8):1891-8.
34. Verma S, Anderson TJ. The ten most commonly asked questions about endothelial function in cardiology. *Cardiology in review*. 2001;9(5):250-2.
35. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1996;78(2):225-30.
36. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation research*. 1995;76(6):980-6.
37. Schmidt AM, Stern D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Current atherosclerosis reports*. 2000;2(5):430-6.
38. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*. 2002;91(4):281-91.
39. Marzilli M, Goldstein S, Trivella MG, Palumbo C, Maseri A. Some clinical considerations regarding the relation of coronary vasospasm to coronary atherosclerosis: a hypothetical pathogenesis. *The American journal of cardiology*. 1980;45(4):882-6.
40. Chan P, Patel M, Betteridge L, Munro E, Schachter M, Wolfe J, et al. Abnormal growth regulation of vascular smooth muscle cells by heparin in patients with restenosis. *Lancet*. 1993;341(8841):341-2.
41. Bentzon JF, Weile C, Sondergaard CS, Hindkjaer J, Kassem M, Falk E. Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(12):2696-702.
42. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nature communications*. 2012;3:875.
43. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(6):1248-58.
44. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(9):1370-80.
45. Kavurma MM, Tan NY, Bennett MR. Death receptors and their ligands in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(10):1694-702.
46. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11(5):1223-30.
47. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(6):2493-503.
48. Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circulation research*. 2014;114(1):214-26.

49. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999;99(19):2503-9.
50. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(1):36-46.
51. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481-8.
52. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):883-4.
53. Kramer MC, Rittersma SZ, de Winter RJ, Ladich ER, Fowler DR, Liang YH, et al. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(2):122-32.
54. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England journal of medicine*. 2013;368(21):2004-13.
55. Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skafien MD, Fuster V, McNamara CA. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circulation research*. 2012;110(6):889-900.
56. Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Horkko S, et al. The role of natural antibodies in atherogenesis. *Journal of lipid research*. 2005;46(7):1353-63.
57. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circulation research*. 2014;114(10):1640-60.
58. Ponnuswamy P, Van Vre EA, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: spotlight on B- and T-cells. *Vascular pharmacology*. 2012;56(5-6):193-203.
59. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*. 2011;12(3):204-12.
60. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circulation research*. 2014;114(11):1743-56.
61. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145(1):33-43.
62. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circulation research*. 2008;103(5):467-76.
63. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(4):251-63.
64. Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):195-201.
65. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B Cells in Atherosclerosis: Closing the Gap From Bench to Bedside. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014.

66. Mohanta SK, Yin C, Peng L, Srikakulapu P, Bontha V, Hu D, et al. Artery tertiary lymphoid organs contribute to innate and adaptive immune responses in advanced mouse atherosclerosis. *Circulation research*. 2014;114(11):1772-87.
67. Hamze M, Desmetz C, Berthe ML, Roger P, Boulle N, Brancherau P, et al. Characterization of resident B cells of vascular walls in human atherosclerotic patients. *Journal of immunology*. 2013;191(6):3006-16.
68. Vinuesa CG, Chang PP. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nature immunology*. 2013;14(2):119-26.
69. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):745-53.
70. Major AS, Fazio S, Linton MF. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(11):1892-8.
71. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(8):1579-87.
72. Kyaw T, Tay C, Khan A, Dumouchel V, Cao A, To K, et al. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *Journal of immunology*. 2010;185(7):4410-9.
73. Kyaw T, Tay C, Hosseini H, Kanellakis P, Gadowski T, MacKay F, et al. Depletion of B2 but not B1a B cells in BAFF receptor-deficient ApoE mice attenuates atherosclerosis by potently ameliorating arterial inflammation. *PloS one*. 2012;7(1):e29371.
74. Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(7):564-76.
75. Roman MJ, Salmon JE. Cardiovascular manifestations of rheumatologic diseases. *Circulation*. 2007;116(20):2346-55.
76. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2003;349(25):2399-406.
77. Devalapalli AP, Leshner A, Shieh K, Solow JS, Everett ML, Edala AS, et al. Increased levels of IgE and autoreactive, polyreactive IgG in wild rodents: implications for the hygiene hypothesis. *Scand J Immunol*. 2006;64(2):125-36.
78. Elsheikh E, Sylven C, Henareh L. Anti-endothelial cell antibodies are increased in patients with previous myocardial infarction. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*. 2010;44(5):255-9.
79. Wang J, Cheng X, Xiang MX, Alanne-Kinnunen M, Wang JA, Chen H, et al. IgE stimulates human and mouse arterial cell apoptosis and cytokine expression and promotes atherogenesis in ApoE^{-/-} mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(9):3564-77.
80. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(3):427-37.

81. Lewis MJ, Malik TH, Ehrenstein MR, Boyle JJ, Botto M, Haskard DO. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2009;120(5):417-26.
82. van Leeuwen M, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Tervaert JW. The therapeutic potential of targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2009;9(1):53-7.
83. Pham T, Gregg CJ, Karp F, Chow R, Padler-Karavani V, Cao H, et al. Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood*. 2009;114(25):5225-35.
84. World Health Organization., International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia : report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization. p. p.
85. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;87(1):4-14.
86. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama*. 2002;287(19):2570-81.
87. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2003;348(5):383-93.
88. 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:S14-21.
89. Feskens EJ, Kromhout D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. *Journal of clinical epidemiology*. 1992;45(11):1327-34.
90. Kjaergaard SC, Hansen HH, Fog L, Bulow I, Christensen PD. In-hospital outcome for diabetic patients with acute myocardial infarction in the thrombolytic era. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*. 1999;33(3):166-70.
91. Malmberg K, Yusuf S, Gerstein HC, Brown J, Zhao F, Hunt D, et al. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation*. 2000;102(9):1014-9.
92. Newman AB, Siscovick DS, Manolio TA, Polak J, Fried LP, Borhani NO, et al. Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. *Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group*. *Circulation*. 1993;88(3):837-45.
93. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes care*. 2001;24(8):1433-7.
94. Uusitupa MI, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K. 5-year incidence of atherosclerotic vascular disease in relation to general risk factors, insulin level, and abnormalities in lipoprotein composition in non-insulin-dependent diabetic and nondiabetic subjects. *Circulation*. 1990;82(1):27-36.
95. Fabris F, Zanicchi M, Bo M, Fonte G, Poli L, Bergoglio I, et al. Carotid plaque, aging, and risk factors. A study of 457 subjects. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994;25(6):1133-40.

96. Friedlander AH, Maeder LA. The prevalence of calcified carotid artery atheromas on the panoramic radiographs of patients with type 2 diabetes mellitus. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2000;89(4):420-4.
97. Jamrozik K, Broadhurst RJ, Forbes S, Hankey GJ, Anderson CS. Predictors of death and vascular events in the elderly : the Perth Community Stroke Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000;31(4):863-8.
98. Jorgensen H, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Stroke in patients with diabetes. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994;25(10):1977-84.
99. Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, Shea S, Mayeux R. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *American journal of epidemiology*. 2001;154(7):635-41.
100. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(3):567-74.
101. 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.
102. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;263(3):681-4.
103. Zou M, Yesilkaya A, Ullrich V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug metabolism reviews*. 1999;31(2):343-9.
104. Hennes MM, O'Shaughnessy IM, Kelly TM, LaBelle P, Egan BM, Kissebah AH. Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals. Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1996;28(1):120-6.
105. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(8 Suppl 3):S227-32.
106. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66.
107. Ying Z, Xie X, Chen M, Yi K, Rajagopalan S. Alpha-lipoic acid activates eNOS through activation of PI3-kinase/Akt signaling pathway. *Vascular pharmacology*. 2015;64:28-35.
108. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(1):60-9.
109. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circulation research*. 2001;88(12):1291-8.
110. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000;49(9):1561-70.
111. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*. 2001;50(4):851-60.

112. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2001;24(8):1476-85.
113. Assert R, Scherk G, Bumbure A, Pirags V, Schatz H, Pfeiffer AF. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia*. 2001;44(2):188-95.
114. Levy J. Abnormal cell calcium homeostasis in type 2 diabetes mellitus: a new look on old disease. *Endocrine*. 1999;10(1):1-6.
115. Pellegatta F, Folli F, Ronchi P, Caspani L, Galli L, Vicari AM. Deranged platelet calcium homeostasis in poorly controlled IDDM patients. *Diabetes care*. 1993;16(1):178-83.
116. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *Journal of diabetes and its complications*. 2001;15(1):44-54.
117. Ceriello A, Giacomello R, Stel G, Motz E, Taboga C, Tonutti L, et al. Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes. The possible role of oxidative stress. *Diabetes*. 1995;44(8):924-8.
118. Nordt TK, Bode C. Impaired endogenous fibrinolysis in diabetes mellitus: mechanisms and therapeutic approaches. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2000;26(5):495-501.
119. Patel SN, Rajaram V, Pandya S, Fiedler BM, Bai CJ, Neems R, et al. Emerging, noninvasive surrogate markers of atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2004;6(1):60-8.
120. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006;37(1):87-92.
121. Iwakiri T, Yano Y, Sato Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Fujimoto S, et al. Usefulness of carotid intima-media thickness measurement as an indicator of generalized atherosclerosis: findings from autopsy analysis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):359-62.
122. Chatterjee Adhikari M, Guin A, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, Ghosh A. Subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with early rheumatoid arthritis as evidenced by measurement of carotid intima-media thickness and flow-mediated vasodilatation: an observational study. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2012;41(5):669-75.
123. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115(4):459-67.
124. Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and lower extremity arterial atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(12):1885-91.
125. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. The New England journal of medicine*. 1999;340(1):14-22.
126. Wyman RA, Mays ME, McBride PE, Stein JH. Ultrasound-detected carotid plaque as a predictor of cardiovascular events. *Vascular medicine*. 2006;11(2):123-30.

127. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2008;21(2):93-111; quiz 89-90.
128. Feinstein SB, Voci P, Pizzuto F. Noninvasive surrogate markers of atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2002;89(5A):31C-43C; discussion C-4C.
129. Peters SA, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KG. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart*. 2012;98(3):177-84.
130. Mathiesen EB, Johnsen SH, Wilsgaard T, Bonna KH, Lochen ML, Njolstad I. Carotid plaque area and intima-media thickness in prediction of first-ever ischemic stroke: a 10-year follow-up of 6584 men and women: the Tromso Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(4):972-8.
131. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):128-33.
132. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *The American journal of medicine*. 2004;116 Suppl 6A:9S-16S.
133. Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y, et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation*. 2001;104(1):63-7.
134. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*. 2002;105(17):2019-23.
135. Mangge H, Schauenstein K, Stroedter L, Griesl A, Maerz W, Borkenstein M. Low grade inflammation in juvenile obesity and type 1 diabetes associated with early signs of atherosclerosis. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2004;112(7):378-82.
136. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorogawa S, Kuroda A, et al. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2002;25(8):1432-8.
137. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
138. Brebner JA, Stockley RA. Polyclonal free light chains: a biomarker of inflammatory disease or treatment target? *F1000 medicine reports*. 2013;5:4.
139. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Colby CL, et al. Use of nonclonal serum immunoglobulin free light chains to predict overall survival in the general population. *Mayo Clinic proceedings*. 2012;87(6):517-23.
140. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clinical chemistry*. 2002;48(9):1437-44.

141. Altinier S, Seguso M, Zaninotto M, Varagnolo M, Adami F, Angeli P, et al. Serum free light chain reference values: a critical approach. *Clinical biochemistry*. 2013;46(7-8):691-3.
142. Abadie JM, Bankson DD. Assessment of serum free light chain assays for plasma cell disorder screening in a Veterans Affairs population. *Annals of clinical and laboratory science*. 2006;36(2):157-62.
143. Hutchison CA, Harding S, Hewins P, Mead GP, Townsend J, Bradwell AR, et al. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(6):1684-90.
144. Hutchison CA, Cockwell P, Harding S, Mead GP, Bradwell AR, Barnett AH. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with type II diabetes: an early marker of diabetic kidney disease? Expert opinion on therapeutic targets. 2008;12(6):667-76.
145. Jackson CE. Combined free light chains: a novel predictor of prognosis in heart failure. *JACC Heart failure*. 2015.
146. Shantsila E, Wrigley B, Lip GY. Free light chains in patients with acute heart failure secondary to atherosclerotic coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 2014;114(8):1243-8.
147. Teppo AM, Groop L. Urinary excretion of plasma proteins in diabetic subjects. Increased excretion of kappa light chains in diabetic patients with and without proliferative retinopathy. *Diabetes*. 1985;34(6):589-94.
148. Groop L, Makiperna A, Stenman S, DeFronzo RA, Teppo AM. Urinary excretion of kappa light chains in patients with diabetes mellitus. *Kidney international*. 1990;37(4):1120-5.
149. Thethi TK. Urinary free light chain excretion in obesity and diabetes. 2013.
150. Bellary S, Faint JM, Assi LK, Hutchison CA, Harding SJ, Raymond NT, et al. Elevated serum free light chains predict cardiovascular events in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2014;37(7):2028-30.
151. Schmoelzer I, Renner W, Paulweber B, Malaimare L, Iglseder B, Schmid P, et al. Lack of association of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase with manifest coronary artery disease, carotid atherosclerosis and forearm vascular reactivity in two Austrian populations. *European journal of clinical investigation*. 2003;33(3):191-8.
152. Riley WA, Barnes RW, Applegate WB, Dempsey R, Hartwell T, Davis VG, et al. Reproducibility of noninvasive ultrasonic measurement of carotid atherosclerosis. The Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1992;23(8):1062-8.
153. Stork S, van den Beld AW, von Schacky C, Angermann CE, Lamberts SW, Grobbee DE, et al. Carotid artery plaque burden, stiffness, and mortality risk in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Circulation*. 2004;110(3):344-8.
154. Nicholls SJ, Hsu A, Wolski K, Hu B, Bayturan O, Lavoie A, et al. Intravascular ultrasound-derived measures of coronary atherosclerotic plaque burden and clinical outcome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(21):2399-407.
155. Burmeister A, Assi LK, Ferro CJ, Hughes RG, Barnett AH, Bellary S, et al. The relationship between high-sensitivity CRP and polyclonal free light chains as markers of

inflammation in chronic disease. *International journal of laboratory hematology*. 2014;36(4):415-24.

156. Braber S, Thio M, Blokhuis BR, Henricks PA, Koelink PJ, Groot Kormelink T, et al. An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(8):817-24.

157. van der Heijden M, Kraneveld A, Redegeld F. Free immunoglobulin light chains as target in the treatment of chronic inflammatory diseases. *European journal of pharmacology*. 2006;533(1-3):319-26.

158. Streja D, Cressey P, Rabkin SW. Associations between inflammatory markers, traditional risk factors, and complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications*. 2003;17(3):120-7.