

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. G. Ertl

**Die klinische Wertigkeit von „High-Molecular-Weight“  
Adiponektin  
bei der Koronaren Herzkrankheit**

**Untersuchungen zur Rolle eines neuen kardiovaskulären  
Risikoprädiktors  
und dessen pharmakologischer Beeinflussung durch Atorvastatin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annabelle Blümm  
aus Fulda

Würzburg, Dezember 2009

**Referent:** Prof. Dr. B. Allolio

**Koreferent:** Prof. Dr. U. Walter

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2010

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Für meine Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Allgemeine Einleitung .....	1
1.2 Adiponektin .....	3
1.2.1 Allgemein: Adipozytokine .....	3
1.2.2 Geschichte und Entdeckung des Adiponektin .....	4
1.2.3 Struktur und Multimerisation von Adiponektin.....	5
1.2.4 Expression und Sekretion von Adiponektin.....	6
1.2.5 Adiponektin und Adiponektinrezeptoren .....	7
1.2.6 Die Rolle von Adiponektin bei Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2.....	9
1.2.7 Die Rolle von Adiponektin im Fettstoffwechsel .....	11
1.2.8 Die Rolle von Adiponektin bei Inflammation, Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit .....	12
1.3 HMW-Adiponektin.....	15
1.3.1 Charakteristik des HMW-Adiponektins .....	15
1.3.2 HMW-Adiponektin, Wertigkeit und biologische Funktionalität.....	15
1.4 Fragestellung .....	17
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	20
2.1 Materialien und Geräte .....	20
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Untersuchungsaufbau - Übersicht .....	21
2.2.2 Patienten.....	22
2.3 Biochemische Analysen .....	24
2.3.1 Bestimmung der Plasmakonzentration von Adiponektin mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	24
2.3.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von HMW-Adiponektin mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	25
2.3.3 Ratio .....	26

## Inhaltsverzeichnis

2.3.4 Messung von Lipiden und Lipoproteinen.....	27
2.3.5 Bestimmung der Insulinresistenz .....	27
2.3.6 Erfassung von Nüchtern-Glukose, Plasmainsulinspiegel, CRP-und IL-6 Spiegel .....	28
2.4 Koronarangiographie .....	28
2.5 Atorvastatin (Sortis®) .....	30
2.6 Statistische Analysen .....	31
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<i>Querschnittsstudie</i> .....	34
3.1 Patientenkollektiv .....	34
3.2 Assoziationen zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin, Ratio und klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren .....	35
3.3 Adiponektin, HMW-Adiponektin, Ratio und der Schweregrad der Koronaren Herzerkrankung .....	40
3.3.1 Beziehung zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio und dem angiographischen Schweregrad einer prävalenten KHK .....	40
3.3.2 Graphische Darstellung der beobachteten Korrelationen zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit dem angiographischen Schweregrad einer prävalenten KHK.....	42
3.4 HMW-Adiponektin, Ratio und das relative Risiko für eine prävalente Koronare Herzerkrankung .....	44
3.5 Multivariable Regressionsanalyse .....	47
3.6 ROC-Analyse.....	49
<i>Interventionsstudie</i> .....	52
3.7 Patientenkollektiv .....	52
3.8 Klinische und biochemische Veränderungen nach.....	53
8-wöchiger Atorvastatintherapie.....	53
3.9 Einfluss der Atorvastatinbehandlung auf Adiponektin, HMW-Adiponektin und die Ratio.....	54

<b>4. Diskussion</b> .....	57
4.1 Adiponektin, HMW-Adiponektin und Koronare Herzkrankheit: Assoziationen und mögliche Effekte.....	57
4.2 HMW-Adiponektin und Kalkulation der Adiponektin/HMW-Adiponektin Ratio: Diagnostische und therapeutische Perspektiven .....	62
4.3 Adiponektin: Ein neues Target pleiotroper Statineffekte ? .....	64
4.4 Statine und HMW-Adiponektin: Gemeinsame Assoziationen als Hinweis auf eine kausale Verknüpfung? .....	65
4.5 PPAR-Aktivierung: Der fehlende Link zwischen Statin und Adiponektin?	68
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	72
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

AMPK	-	Adenosine monophosphate activated protein kinase
AGE	-	Advanced-glycated-endproducts
Apo	-	Apolipoprotein
AUC	-	Area under the Curve
BMI	-	Body mass index
CRP	-	C-reaktives Protein
eNOS	-	endotheliale NO-Synthetase
HDL	-	High density lipoprotein
HL	-	Hepatische Lipase
HOMA	-	Homeostase Model Assessment
HMW	-	High-molecular-weight
HMG-CoA	-	3-Hydroxy-1-Methylglutaryl-Coenzym-A
IL-6	-	Interleukin-6
ICAM	-	Intercellular adhesion molecule
KHK	-	Koronare Herzkrankheit
LDL	-	Low density lipoprotein
LPL	-	Lipoproteinlipase
LMW	-	Low-molecular-weight
MCP-1	-	Monocyte chemoattractant protein
MMW	-	Medium-molecular-weight
NFκ-B	-	Nuclear factor kappa-B
PPAR	-	Peroxisome proliferator activated receptor
PAI-1	-	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PDK	-	Pyruvatdehydrogenase kinase
PGC-1	-	Peroxisome proliferator-aktivator receptor-γ coactivator 1
PKA	-	Proteinkinase A
RXR	-	9-cis retinoic acid receptors
SR-A1/2	-	Makrophagen-Scavenger-Receptor

## Abkürzungsverzeichnis

SREBP	-	Sterol response element binding protein
TNF- $\alpha$	-	Tumor Nekrose Faktor-alpha
VCAM	-	Vascular cell adhesion molecule
VLDL	-	Very low densitiy lipoprotein

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gehören in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität verbunden mit Hospitalisation und sind führend in populationsbasierten Mortalitätsstatistiken. Die bedeutsamste Form der Herz-Kreislauf-Erkrankung stellt die Koronare Herzkrankheit (KHK) dar, die sich klinisch klassischerweise in Form von Angina pectoris Anfällen äußert und den akuten Myokardinfarkt als schwerwiegende Komplikation aufweist.

Nach Stand des Statistischen Bundesamtes 2006 führen die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 9,5% und der akute Myokardinfarkt mit 7,3% die Statistik der Todesursachen in Deutschland an. Zum Vergleich sind andere Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Schlaganfall nur für einen Anteil von 5,7 und 3,5% aller Todesursachen verantwortlich.

Atherosklerotische Gefäßveränderungen spiegeln als pathophysiologisches Korrelat den klinischen Verlauf der KHK wider. Diese vaskulären Läsionen sind durch eine Vielzahl zeitlich hintereinander ablaufender histopathologischer Veränderungen bzw. Stadien gekennzeichnet. So kommt es initial zur Inflammation der Gefäßwand mit Einwanderung von Makrophagen und Monozyten. Diese mononukleären Zellen phagozytieren Cholesterin aus Lipoproteinen wie z.B. LDL und differenzieren sich weiter zu Schaumzellen. Hieraus resultiert die Bildung sog. (lipidhaltiger) Atherome, die häufig mit der Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßmedia einhergehen. Diese Veränderungen führen zur Vorwölbung von atheromatösen Plaques in das Gefäßlumen mit konsekutiver Beeinträchtigung des myokard-versorgenden diastolischen Blutstromes.

## Einleitung

Bei höhergradigen Einengungen der Herzkranzgefäße resultiert ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot in der Herzmuskulatur mit der Folge von Angina pectoris und/oder Herzinfarkt. In großen epidemiologischen Studien konnten eine Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren identifiziert werden, die kausal an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind. Die bekanntesten und wichtigsten werden als klassische Risikofaktoren bezeichnet. Hierzu zählen unter anderem die Hyperlipidämie als bedeutendster Risikofaktor, der Diabetes mellitus, Nikotinabusus und die arterielle Hypertonie. Neben diesen klassischen Risikofaktoren (s. o.) ist inzwischen jedoch erkannt worden, dass Patienten mit metabolen Störungen einem zusätzlichen kardiovaskulären Risiko ausgesetzt sind. Dies führte zu der Definition des „Metabolischen Syndroms“. Das Metabolische Syndrom umfasst fünf klinische Komponenten mit dem Ziel, Patienten mit einem erhöhten kardiometabolen Risiko klinisch frühzeitig identifizieren zu können. Heute weiß man, dass die viszerale Adipositas eine herausragende Rolle in der Pathogenese dieser metabolischen Störungen spielt und man spricht in diesem Zusammenhang von einem Cluster kardio-metaboler Risikofaktoren.

Das Fettgewebe ist weit mehr als nur ein passives Speicherorgan für überschüssige Energiereserven, für das es früher gehalten wurde. Adipozyten sezernieren eine Vielzahl biologisch aktiver Moleküle, die in ihrer Gesamtheit als Adipozytokine bezeichnet werden. Zahlreiche Studien und Untersuchungen der letzten 10 Jahre konnten ein neues Adipozytokin, das Adiponektin, identifizieren und charakterisieren und so eine Schlüsselrolle im Fettstoffwechsel beschreiben. Darüber hinaus vermittelt Adiponektin aber auch anti-inflammatorische und anti-atherosklerotische Effekte an Endothelzellen der Gefäßwände. So konnte Adiponektin in einem etablierten Tiermodell der Atherosklerose (ApoE -/-) das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen signifikant reduzieren. In klinischen Studien waren erniedrigte Adiponektinspiegel mit einem erhöhten Ausmaß koronarangiographisch

## Einleitung

erfasster Gefäßläsionen assoziiert und in einem 7-jährigen Beobachtungszeitraum im Rahmen der „Physicians Health Follow-up Study“ erlitten Probanden mit den höchsten Adiponektinspiegeln signifikant weniger Herzinfarkte als Probanden mit sehr niedrigen Adiponektinkonzentrationen. Diese Beobachtungen haben Adiponektin auch die Bezeichnung eines Anti-Atherosklerosefaktors eingebracht.

Eine weitere wichtige Funktion von Adiponektin ist die Regulation der Insulinsensitivität. In diesem Zusammenhang konnte schlüssig gezeigt werden, dass nicht nur Patienten mit manifester KHK, sondern auch Patienten mit einem Typ 2 Diabetes erniedrigte Adiponektinspiegel aufweisen. Darüber hinaus zeigten große prospektive Studien, dass die Konzentration des zirkulierenden Adiponektins ein unabhängiger Prädiktor für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes, sowohl in einem Hoch-Risikokollektiv der Pima Indianer, aber auch in kaukasischen Kollektiven darstellt. Diese Ergebnisse unterstreichen warum Adiponektin ein bedeutendes bioaktives Protein bei der Entstehung und Progression metabolischer Komplikationen, wie etwa Typ 2 Diabetes oder atherogener Dyslipidämie, ist. Darüber hinaus stellt ein erniedrigter Adiponektinspiegel einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Therapeutische Interventionen, mit dem Ziel die Konzentration von Adiponektin zu erhöhen, könnten zukünftig einen verbesserten Ansatz zur erfolgreichen Prävention kardio-metaboler Komplikationen darstellen.

## 1.2 Adiponektin

### 1.2.1 Allgemein: Adipozytokine

Wie Forschungen der letzten Jahre zeigten, ist das Fettgewebe kein passives Speicherorgan für Lipide, sondern vielmehr ein endokrines Organ, welchem

## Einleitung

eine bedeutende Rolle in der Steuerung metabolischer, endokriner und inflammatorischer Prozesse zukommt (10; 40; 81; 96; 106).

So sezerniert das Fettgewebe zusätzlich zu freien Fettsäuren eine Reihe bioaktiver Proteine, welche als Adipozytokine bezeichnet werden. Zu diesen Proteinen zählen u. a. Adiponektin, Adipsin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), Resistin, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Leptin (10; 28; 36; 40; 80; 95; 96).

Adiponektin markiert das Adipozytokin, welches mit der höchsten Konzentration im Blut zirkuliert (im Bereich von mehreren  $\mu\text{g/ml}$ ) und so einen Anteil von bis zu 0.05% der Gesamtplasmaproteine ausmacht (96).

Die Konzentration des zirkulierenden Adiponektins unterliegt nur sehr geringen zirkadianen Schwankungen und zeigt keine Veränderungen auf kurzfristige prandiale oder physische Reize. Daher sind Messungen von Adiponektin als potentiellen klinischen Marker für Stoffwechsel- und Gefäßerkrankungen in der Diagnostik sehr gut reproduzierbar (20).

### 1.2.2 Geschichte und Entdeckung des Adiponektin

Adiponektin wurde ursprünglich von vier unabhängigen Gruppen identifiziert und benannt. Zuerst entdeckten es Scherer et al. und bezeichneten es als „Adipocyte complement-related protein“ von 30 kDa (Acrp 30) (39). Spiegelman et al. benannten diesen Botenstoff „ Adipo Q“ (39). Beide Gruppen nutzten c-DNA von Mäusen und klonierten diese jeweils vor und nach der Differenzierung von 3T3-L1- und 3T3-F442A- Mausadipozyten (39; 40; 81; 96). Ferner wurde humanes Adiponektin von Matsuzawa et al. aus Fettgewebe extrahiert und als „adipose most abundant gene transcript 1“ (apM1) bezeichnet (55; 96). Schließlich isolierten Tomita et al. Adiponektin als „gelatin-binding-protein“ mit einer Masse von 28 kDa (GBP28) (40; 63; 97).

## Einleitung

### 1.2.3 Struktur und Multimerisation von Adiponektin

Humanes Adiponektin ist ein 244 Aminosäuren großes Protein mit einer Masse von ca. 30 kDa, das fast ausschließlich von Adipozyten des viszeralen Fettgewebes gebildet und sezerniert wird. Das subkutane Fettgewebe spielt in der Produktion dieses Hormons nur eine sehr geringe Rolle. Strukturell gesehen gehört es zur Familie der Komplementfaktoren und besitzt eine große Homologie zu C1q (10; 18; 40; 54; 96; 98). Adiponektin wird durch das APM1-Gen, das auf Chromosom 3q27 lokalisiert ist, kodiert (46; 90). Bereits auf zellulärer Ebene existiert Adiponektin in verschiedenen Isoformen: Monomere (~30 kDa), Trimere (~90 kDa), Hexamere (~120-150 kDa) und höherkomplexige Multimere (> 200 kDa). Das Monomer weist eine amino-terminale Sequenz, eine kurze nicht-helikale, variable Region, eine kollagene Domäne (cAd) und eine carboxy-terminale globuläre Domäne (gAd) auf (10; 96).

In der Zirkulation findet man Adiponektin als Trimere, welche durch Assoziation dreier Monomere um die globuläre Domäne entstehen und als „low-molecular-weight“ (LMW)-Form bezeichnet werden. Desweiteren liegen Hexamere, welche aus zwei Trimeren bestehen, vor. Diese beiden Strukturen werden auch als die „medium-molecular-weight“ (MMW)-Form bezeichnet. Eine Zusammenlagerung von vier bis sechs Trimeren über ihre kollagenen Domänen zu höhergeordneten Strukturen, den so genannten Multimere, wird als „high-molecular-weight“ (HMW)-Form bezeichnet (10; 63; 65; 96). Für die globuläre Domäne ist eine starke Homologie zu einem weiteren Adipozytokin, dem TNF- $\alpha$ , sowie zu bestimmten Kollagentypen wie Typ VIII und Typ X bekannt (63; 78; 79; 96).

Posttranslationale Modifikationen von Adiponektinkomplexen spielen eine wichtige Rolle bei der Definition seiner biologischen Aktivität. So wurden Hydroxylierungen und Glykosylierungen, großteils von Lysinresten 68, 71, 80 und 104 berichtet, die spezifisch für die Bildung höherkomplexiger Strukturen (HMW) von Bedeutung sind (40; 92; 96).

## Einleitung

Vor allem Cystein-Reste, die sich in der amino-terminalen Region befinden, sind an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt und essentiell für die Bildung dieser Multimere (40; 72; 87; 91; 96). Es wird vermutet, dass höherkomplexige Adiponektinmoleküle die aktive Form dieses Proteins darstellen und es bestehen erhebliche Unterschiede in den biologischen Aktivitäten und Effekten der verschiedenen Isoformen (92).

### 1.2.4 Expression und Sekretion von Adiponektin

Die Expression und Sekretion von Adiponektin findet sowohl in den Adipozyten des weißen, als auch des braunen Fettgewebes statt (73; 96; 105). Schon sehr früh wurde von Spiegelman et al. vermutet, dass die Produktion des Proteins bei adipösen Personen reduziert ist. Er beobachtete herabgesetzte m-RNA- Konzentrationen von Adiponektin im Fettgewebe von übergewichtigen Mäusen (*ob/ob*) und Menschen (39). Matsuzawas Gruppe konnte dies bestätigen und zeigte zudem, dass eine Gewichtsabnahme den Adiponektinspiegel bei Mäusen und Menschen erhöht (4; 38). Männer weisen niedrigere zirkulierende Adiponektinspiegel auf als Frauen und auch der Anteil des HMW-Adiponektins am Gesamtadiponektin ist beim männlichen Geschlecht im Vergleich zum weiblichen reduziert (4; 100). Aus *in vitro* Versuchen weiß man, dass Androgene einen hemmenden Effekt auf die Produktion von Adiponektin in Fettzellen haben (38).

Die Expression und Sekretion von Adiponektin wird auch durch den TNF- $\alpha$  vermindert (10; 42). So zeigte sich bei einer 24-stündigen Behandlung von 3T3-L1-Adipozyten mit TNF- $\alpha$  eine reduzierte Adiponektinexpression in diesen Zellen (27; 57; 96). Aus klinischen Studien weiß man, dass die Konzentration von Adiponektin im Alter ansteigt, eine Beobachtung, die vermutlich im Zusammenhang mit erhöhten Adiponektinspiegeln bei reduzierter Nierenfunktion stehen könnte, auch wenn genaue Mechanismen und renale Clearancevorgänge noch unbekannt sind.

## Einleitung

Ferner existieren Vermutungen, dass Adiponektin auch extra-adipozytär exprimiert und sezerniert wird. So wurde der Nachweis von Adiponektin mRNA auch im Leberparenchym von Mäusen und humanen Leberbiopsien von Patienten mit Steatosis hepatis erbracht (43).

Weitere Arbeiten beschreiben den immunhistochemischen Nachweis von Adiponektin in Endothelzellen portaler Gefäße und Lebersinusoiden. Ebenso wurde eine Expression von Adiponektin in der Skelettmuskulatur beschrieben (19; 83).

### 1.2.5 Adiponektin und Adiponektinrezeptoren

Kadowaki und Kollegen isolierten aus Myozyten die c-DNA eines kodierenden Proteins, welches membranständig nach Bindung mit Adiponektin die subzelluläre Signalkaskade von Adiponektin vermittelt.

Sie benannten dieses Protein Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1) (96). Dieser Rezeptor wird ubiquitär exprimiert, jedoch vorrangig in der Skelettmuskulatur. Weitere Analysen führten sie zu einem weiteren homologen Rezeptor, der hauptsächlich in den Hepatozyten nachgewiesen wurde und als Adiponektinrezeptor 2 (AdipoR2) bezeichnet wurde (40; 43; 96). Beide Rezeptoren, AdipoR1 (375 Aminosäuren: 42,4 kDa) und AdipoR2 (311 Aminosäuren: 35,4 kDa), sind Proteine mit sieben transmembranen Domänen. Sie gehören zur Klasse der Typ IV-A-Proteine mit einem intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus und unterscheiden sich dadurch von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (40; 96; 101). Beide Adiponektinrezeptoren bilden Homo- und Heteromultimere.

Funktionelle Analysen zeigten, dass AdipoR1 ein Rezeptor für den globulären Anteil des Adiponektins darstellt, während AdipoR2 ausschließlich die full-length Form des Adiponektins bindet (40; 101).

Die Bindung von Adiponektin an seine beiden Rezeptoren bewirkt eine erhöhte Phosphorylierung der adenosine 5'-monophosphate-activated

## Einleitung

protein (AMP)-Kinase sowie eine gesteigerte anti-inflammatorische peroxisome-proliferator-activated-receptor (PPAR)- $\alpha$ -Aktivität (17).

Die AMP-Kinase ist ein phosphoryliertes Protein, das eine Schlüsselrolle in den metabolischen Stoffwechselforgängen der hepatischen Glukoneogenese, Cholesterinbiosynthese, Lipogenese, Triglyzeridsynthese, Lipolyse und  $\beta$ -Oxidation der Skelettmuskulatur spielt. Eine Aktivierung der AMP-Kinase bewirkt somit eine Stimulation der Fettsäureoxidation in der Leber, eine Hemmung der Cholesterinbiosynthese, der Lipogenese und der Triglyzeridsynthese und eine Hemmung der Lipolyse der Skelettmuskulatur. Gleichzeitig kommt es zu einer Stimulation der  $\beta$ -Oxidation und erhöhten Glukoseaufnahme der Monozyten (64). Diese Stoffwechselforgänge sind entscheidend an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt. Adiponektin war in zahlreichen klinischen Studien ein potenter Marker für Insulinsensitivität und eine Verbesserung der Insulinresistenz ist mit einem Anheben der Adiponektinspiegel im Blut zu erreichen (82). Übergewicht ist der Hauptfaktor in der Entstehung von Insulinresistenz. Die Skelettmuskulatur von adipösen Mäusen (ob/ob) weist eine niedrigere mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 auf (89). Gleichzeitig ist die Bindung von globulärem und full-length-Adiponektin an seine Rezeptoren reduziert (40). Dies führte zu der Annahme, dass neben einer verringerten Gesamtmenge zirkulierenden Adiponektins und einer herabgesetzten Produktion seines korrespondierenden Rezeptors auch eine mögliche adipositas-assoziierte Adiponektinresistenz zu den metabolischen Veränderungen einer Hypoadiponektinämie beitragen könnte (89; 96).

Neueste Studien beschreiben eine Adiponektinrezeptorexpression in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und beide Rezeptoren wurden auch in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen und auf Endothelzellen gefunden (45). Interessanterweise findet man eine besonders hohe Rezeptordichte in den atherosklerotischen Läsionen von Blutgefäßen (13; 96).

## Einleitung

### 1.2.6 Die Rolle von Adiponektin bei Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

Studien belegen, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen vermindertem Adiponektin und erniedrigter Insulinsensitivität gibt, bzw. dass Adiponektin einen wichtigen Regulator der Insulinsensitivität darstellt (1; 88; 96). Klinische Assoziationen und direkte in vivo Effekte konnten so zwischen Adiponektin und zahlreichen Markern der Insulinsensitivität (Nüchtern-Insulin- und Glukosespiegelbestimmungen, dem Homeostase Model Assessment (HOMA) (61), Glukose- und Insulin-Toleranz-Tests, sowie dem sensitivsten Messinstrument, dem experimentellen hyperinsulinämischen-euglykämischen-Clamp) (29) gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass die Konzentration des zirkulierenden Adiponektins bei Adipositas und Insulinresistenz vermindert ist (1; 39; 40; 70; 94; 96; 104). Adipositas ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes und die Insulinresistenz einer prä-diabetischen Stoffwechsellage ist direkt mit dem Ausmaß der Adipositas assoziiert. In klinischen follow-up Studien konnte gezeigt werden, dass der Adiponektinspiegel mit dem Fortschreiten der Insulinresistenz weiter absinkt (38; 96). Umgekehrt gilt, dass hohe Plasmaspiegel von Adiponektin in gesunden Individuen das Risiko an einem Typ 2 Diabetes mellitus zu erkranken signifikant reduzieren (82; 96). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rekombinantem Adiponektin die insulin-aktivierenden Stoffwechselwege in Mäusen verstärkt (65).

Neben der Verbesserung der peripheren Glukoseutilisation konnte Scherer et al. zeigen, dass eine akute Erhöhung des zirkulierenden Adiponektins in Wildtyp- und Diabetesmausmodellen eine Erniedrigung des Glukosespiegels triggert. Dafür ist eine Hemmung der Enzyme der Glukoneogenese verantwortlich (7; 16; 40). Ferner wird die Konzentration zirkulierender freier Fettsäuren als wichtige pathogenetische Komponente der Insulinresistenz diskutiert. Adiponektin aktiviert die zelluläre  $\beta$ -Oxidation und senkt durch

## Einleitung

diesen intrazellulären Fettsäureverbrauch auch die Konzentration zirkulierender freier Fettsäuren (102).

Weitere Studien demonstrierten, dass sowohl die globuläre als auch die full-length Form des Adiponektins den Glukoseverbrauch und die Fettsäureoxidation über Phosphorylierung und Aktivierung der AMP-Kinase in Skelettmuskelzellen und der Leber fördern, während full-length-Adiponektin diese Effekte nur in der Leber vermitteln konnte (102). Dies waren die ersten Beobachtungen, die auf einen gewebsspezifischen Effekt verschiedener Adiponektinformen schließen ließen.

Bei transgenen Mäusen, die die globuläre Domäne des Adiponektins überexprimieren, zeigt sich nach Kreuzung mit genetisch determinierten Adipositas- und Typ 2 Diabetesmodellen (ob/ob) eine signifikante Verbesserung der Insulinresistenz bei den übergewichtigen Tieren (96). Diese Daten lassen vermuten, dass eine Erhöhung von globulärem Adiponektin einen direkten insulinsensitivierenden Effekt hat, der unabhängig von der Fettgewebsmasse ist (40).

Die Frage, ob und in welchen Konzentrationen globuläres Adiponektin auch im Menschen vorkommt ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Vermutungen, dass durch enzymatische Spaltung (z.B. leukozytäre Elastase) globuläre Adiponektinfragmente auch in der Zirkulation des Menschen vorkommen.

Einen weiteren Hinweis für den direkten insulinsensitivierenden Effekt des Adiponektins lieferten Kadowakis und Matsuzawas Gruppe, als sie in Adiponektin Knockout-Mäusen (Adiponektin  $-/-$ ) eine ausgeprägte Insulinresistenz beschreiben konnten, die durch Adiponektinsupplementation des full-length Hormon vollständig reversibel war (96).

Zukünftige Therapieansätze mit dem Ziel die zirkulierenden Spiegel von Adiponektin zu erhöhen (wie es heute schon durch z. B. PPAR-gamma Agonisten möglich ist) könnten so viel versprechende pathophysiologisch orientierte Behandlungsstrategien von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

## Einleitung

### 1.2.7 Die Rolle von Adiponektin im Fettstoffwechsel

Studien der letzten Jahre belegen einen unabhängigen Zusammenhang zwischen Adiponektin und dem Fettstoffwechsel, der nicht vollständig durch die Effekte von Übergewicht und Insulinresistenz erklärt werden kann. So reduziert Adiponektin den Gehalt von Triglyzeriden in der Skelettmuskulatur von Mäusen (40; 104). In klinischen Studien an Patienten mit Typ 2 Diabetes und /oder KHK korreliert Adiponektin negativ mit der Konzentration zirkulierender Triglyzeride und zeigt eine stark positive Beziehung zum Serum-HDL-Cholesterin (96). Es wird vermutet, dass Adiponektin über den Proteinkinase A (PKA) –Signalweg eine vermehrte hepatische Sekretion von Apolipoprotein A1 (ApoA1) vermittelt. PKA aktiviert die ApoA1-Expression und dies führt zu erhöhten HDL-Cholesterinspiegeln (22; 23). Untersuchungen zeigen, dass Adiponektin positiv mit der Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) korreliert, einem Enzym, dessen erniedrigte Aktivität im Zentrum der Entstehung der diabetischen Dyslipidämie mit erhöhten Triglyzeriden und erniedrigten HDL-Cholesterin steht (24). Darüber hinaus besteht eine negative Beziehung zwischen Adiponektin und der Hepatischen Lipase (HL), einem Enzym, das entscheidend am Katabolismus von HDL-Partikeln beteiligt ist (24). Adiponektin könnte durch Hemmung eines aktivierenden Transkriptionsfaktors, sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c die HL-Expression vermindern und hierdurch zu erhöhten HDL-Spiegeln führen (22). Eine weitere Studie zeigte einen negativen Zusammenhang zwischen Adiponektin und der Konzentration von kleinen LDL-Partikeln, intermediären sowie großen VLDL-Partikelkonzentrationen, eine Lipidkonstellation mit einem besonders hohen atherogenen Potential (82). Erniedrigte Spiegel an Adiponektin gehen zudem mit erhöhten Spiegeln an pro-atherogenen ApoB einher (10; 58). Diese Konstellation des Lipidmetabolismus wird auch unter dem Begriff „Atherogene Dyslipidämie“ zusammengefasst und stellt die charakteristische Fettstoffwechselstörung des Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus oder Insulinresistenz dar.

## Einleitung

### 1.2.8 Die Rolle von Adiponektin bei Inflammation, Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit

Als Atherosklerose bezeichnet man die Veränderungen der mesenchymalen Zellen der Intima und der Media eines Gefäßes.

Durch Trauma eines Gefäßes und/oder Verletzung der Endothelzellschicht kommt es zur Stimulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, zur Adhäsion von Monozyten an das Endothel und zur Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen. Den Initialschritt der Atherogenese stellt hierbei die Anhaftung pro-inflammatorischer mononukleärer Zellen an das geschädigte Endothel und die nachfolgende Transmigration in den subendothelialen Raum dar. Hier nehmen nun gewebsständige Monozyten und Makrophagen oxidierte Lipoproteine wie LDL auf und transdifferenzieren sich zu so genannten Schaumzellen. Diese Schaumzellen verursachen eine Entzündungsreaktion, welche im weiteren Verlauf von den subendothelialen auch auf tiefere Abschnitte der Media übergreift und hier zu einer Proliferation glatter Muskulatur führt.

Aus großen epidemiologischen prospektiven Studien konnten wichtige kausale Faktoren der Atherogenese identifiziert werden. Zu diesen so genannten kardiovaskulären Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose zählen hämodynamische (z.B. arterielle Hypertonie), sozioökonomische (z.B. Stress) anthropometrische (z.B. Adipositas, Alter) und laborchemische Parameter (z.B. LDL-/HDL-Cholesterin, Lp(a)). Adiponektin wurde in klinischen Studien in Zusammenhang mit zahlreichen dieser Risikofaktoren beschrieben. So findet sich ein erniedrigtes Adiponektin bei Rauchern, Patienten mit Übergewicht und Hypertonie (65). Hohe Adiponektinkonzentrationen findet man hingegen bei hohen HDL-Werten und bei schlanken Patienten (65).

Weitere Untersuchungen beschrieben zudem Assoziationen, die mit den anti-atherogenen und anti-inflammatorischen Fähigkeiten von Adiponektin aus in vitro Studien in Zusammenhang stehen könnten. So blockt Adiponektin die

## Einleitung

zellulären pro-inflammatorischen Effekte von TNF- $\alpha$  und schützt Endothelzellen vor der TNF- $\alpha$  induzierten Inflammation (10; 36; 69). Im Serum von Patienten mit KHK finden sich die höchsten CRP-Werte bei solchen, die die niedrigsten Adiponektinlevel aufweisen (59). Prospektive Studien mit definierten kardiovaskulären Endpunkten unterstreichen die Rolle von Adiponektin als Anti-Atherogenesefaktor. So waren in einer großen prospektiven Studie an Männern hohe Plasmaspiegel von Adiponektin mit einem niedrigeren Risiko für einen Myokardinfarkt assoziiert (75).

Niedriges Adiponektin scheint sowohl als Marker für das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung geeignet, als auch unabhängiger Risikofaktor zu sein (75). Kumada et al. zeigten, dass bei Patienten mit einer nachgewiesener KHK niedrigere Adiponektinspiegel vorlagen als bei einer gematchten Kontrollgruppe von freiwilligen Blutspendern (51; 60). In weiteren Studien waren Adiponektinspiegel bei Patienten mit KHK und Diabetes mellitus Typ 2 am niedrigsten, intermediär in der Gruppe der Diabetiker ohne diagnostizierte KHK und am höchsten in der Gruppe gesunder Vergleichsprobanden (37; 60). In mehreren prospektiven Studien zeigte Adiponektin eine inverse Beziehung zu den beobachteten kardiovaskulären Ereignissen. So ließ sich aus jeder Plasmaspiegelerhöhung von Adiponektin um 1  $\mu\text{g/ml}$  eine 3%ige Risikoreduktion für ein kardiovaskuläres Ereignis berechnen (60; 108). Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom haben im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Angina pectoris signifikant niedrigere Adiponektinspiegel, was darauf hindeutet, dass ein Absinken der Konzentration von Adiponektin einen Hinweis auf einen drohenden Infarkt liefern könnte (60; 62). Weitere Studien in dieser Richtung zeigten, dass der Plasmaadiponektinspiegel nicht nur mit dem Vorliegen einer KHK allein negativ korreliert, vielmehr zeigten sich signifikantere Assoziationen mit dem Ausmaß einer KHK in verschiedenen angiographischen Scores (25).

Pathophysiologische Untersuchungen konnten zahlreiche mögliche Effekte von Adiponektin in Zellkulturmodellen zeigen, die in vivo zu den günstigen

## Einleitung

Assoziationen zwischen Adiponektin und kardialem Risiko beitragen könnten. So konnten als wesentliche anti-atherogene Effekte von Adiponektin die Hemmung der Monozytenadhäsion am Endothel, die Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Hemmung der Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen beschrieben werden (68). Endothelzellen exprimieren Adiponektinrezeptoren, über die eine Erhöhung der Stickstoffmonoxidproduktion (NO) vermittelt wird (65). So ist konsekutiv in Adiponektin-Knockout-Mäusen (Adiponektin  $-/-$ ) die endothelvermittelte Vasodilatation verschlechtert (60; 70). Adiponektin $-/-$ -Mäuse zeigen zudem eine verbreiterte Gefäß-Intima und eine verstärkte Proliferation der glatten Muskelzellen nach Verletzung eines Gefäßes (60; 86; 24).

Adiponektin vermittelt anti-inflammatorische und anti-atherosklerotische Effekte, die zahlreiche Initialschritte der Atherogenese günstig beeinflussen. Adiponektin inhibiert in humanen Endothelzellen die durch TNF- $\alpha$ - und nuclear-factor  $\gamma$  (NF) $\kappa$ B-stimulierte Adhäsion von Monozyten durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, E-Selektin und intercellular cell adhesion molecule  $\gamma$  (ICAM)-1 (60; 66; 67). Adiponektin vermindert die Lipidanreicherung in den Makrophagen, indem es die Aufnahme von oxidiertem (ox)-LDL und die Umwandlung zu Schaumzellen reduziert (60; 68; 103). Es bindet außerdem den platelet-derived-growth-factor  $\gamma$  (PDGF)-BB und supprimiert die Migration von glatten Muskelzellen (65).

Nach einer Verletzung des Endothels ist Adiponektin an der Stimulation der Angiogenese und vor allem der Hemmung der Endothelzell-Apoptose beteiligt (48; 96). In einem etablierten Atherosklerosemodell der ApoE KO Maus (ApoE $-/-$ ) konnten sowohl globuläres als auch full-length Adiponektin zu einer signifikanten Reduktion atherosklerotischer Läsionen in vivo führen. Diese Versuche erbrachten so einen direkten Zusammenhang zwischen der Vielzahl potentiell anti-atherosklerotischer Fähigkeiten von Adiponektin und dem histopathologischen Ausmaß vaskulärer und koronarer Gefäßkomplifikationen.

## Einleitung

Zusammengefasst: Neben den positiven Effekten auf Insulinsensitivität und Lipidprofil besitzt Adiponektin eine Vielzahl anti-inflammatorischer und anti-atherogener Fähigkeiten. Diese führen in etablierten Mausmodellen der Atherosklerose zum Schutz vor der Entstehung atherosklerotischer Komplikationen. Beim Menschen scheinen erhöhte Adiponektinspiegel einen möglichen Schutz vor Myokardinfarkt zu bieten und die Bestimmung von Adiponektin im Blut kann als prädiktiver und prognostischer Marker für eine KHK verwendet werden.

### 1.3 HMW-Adiponektin

#### 1.3.1 Charakteristik des HMW-Adiponektins

Die HMW-Isoform des Adiponektins wird durch Assoziation von vier bis sechs Adiponektintrimeren zu höhergeordneten Strukturen gebildet. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass viele bisher bekannte Eigenschaften des Adiponektins nicht nur auf die Masse des Gesamtadiponektins zurückgeführt werden können, sondern vielmehr auf dem Anteil der zirkulierenden HMW-Form dieses Proteins beruhen könnten. Dies hat zu der Überlegung geführt, dass verschiedene multimere Isoformen des Adiponektins unterschiedliche biologische Funktionen ausüben könnten. In der Klinik könnte so der Quotient aus HMW-Adiponektin und Adiponektin, also der Anteil des HMW-Adiponektins am Gesamtadiponektin, den biologisch aktiven Anteil dieses Hormons effizient widerspiegeln.

#### 1.3.2 HMW-Adiponektin, Wertigkeit und biologische Funktionalität

Neueste Erkenntnisse deuten nun darauf hin, dass der Anteil von HMW-Adiponektin an der Gesamtadiponektinkonzentration für die biologisch aktiven Effekte in Stoffwechsel und Atherosklerose verantwortlich ist (5; 52; 53; 92). Der Identifizierung von Struktur-Funktionsbeziehungen der verschiedenen Adiponektin-Multimere sowie die Beschreibung klinisch

## Einleitung

relevanter Assoziationen zwischen den verschiedenen Isoformen und definierten Erkrankungen (wie Typ 2 Diabetes mellitus oder KHK) kommt daher eine große Bedeutung zu und zahlreiche Erkenntnisse resultieren aus jüngster Zeit: Posttranslationale Modifikationen wie Hydroxylierungen und Glykosylierungen der Lysinreste sind essentiell für die Bildung der höhergeordneten Struktur (92). Folglich zeigte sich, dass bei Typ 2 Diabetikern der Grad an Hydroxylierungen und Glykosylierungen von Adiponektin und damit auch der Quotient von HMW-Adiponektin und Adiponektin im Vergleich zu Gesunden reduziert war (92). Im Folgenden war auch die Fähigkeit von Adiponektin die AMP-Kinase in der Leber zu aktivieren vermindert (92). Um die Rolle der posttranslationalen Modifikationen zu analysieren verglich man die Strukturen, die von murinen Fettzellen gebildet wurden mit denen, die von *E. coli* (bei denen keine posttranslationalen Modifikationen stattfinden) geformt wurden. In den *E. coli* war die Bildung der HMW-Struktur nicht möglich, es resultierten lediglich die LMW und MMW-Formen (92). Auch Mutanten, bei denen die Lysinreste ersetzt wurden, bildeten keine HMW-Komplexe.

In funktionellen Untersuchungen zeigte sich, dass die HMW-Komplexe von Adiponektin die aktivste Form in der Unterdrückung der hepatischen Glukoseproduktion sind (92). Ferner ist nur die HMW und nicht die trimere- und hexamere Form in der Lage die Endothelzellen vor Apoptose zu schützen (92). In klinischen Studien konnte die Hypothese vom biologisch aktiven HMW-Adiponektin weiter unterstützt werden. Der Quotient aus HMW-Adiponektin und Gesamtadiponektin korreliert positiv mit der Insulinsensitivität im Menschen (53; 86). Während insulinresistente Patienten im Vergleich zu insulinsensiblen Individuen niedrigere Spiegel von Adiponektin und auch von HMW-Adiponektin aufweisen, zeigt sich kein Unterschied in der Konzentration des LMW-Adiponektins (53).

Eine Behandlung mit Thiazolidindionen führte in zahlreichen Studien zu einem signifikanten Anstieg der Adiponektinkonzentration (96). Trennt man Adiponektin jedoch in seine verschiedenen Isoformen auf, zeigt sich, dass

## Einleitung

diese Erhöhung im Wesentlichen durch eine Erhöhung des HMW- Anteils zu erklären ist (52; 86).

HMW-Adiponektin zirkuliert bei Männern in geringeren Konzentrationen als bei Frauen (5). Auch der Taille-Hüfte-Quotient („waist-to-hip-ratio“) (als klinischer Marker der viszeralen Adipositas) zeigt positive Beziehung zur HMW- Form jedoch nicht zur LMW- Form (53). Da schon berichtet wurde, dass eine Abnahme dieses Quotienten durch Gewichtsabnahme zu einer Erhöhung des Adiponektins führt, ist voraussichtlich diese Erhöhung durch das steigende HMW-Adiponektin verursacht.

HMW-Adiponektin und auch der Quotient zeigen niedrigere Werte bei diabetischen Männern mit KHK als bei jenen ohne KHK (92). Der Quotient kann hier als unabhängiger Prädiktor für eine manifeste KHK bei Patienten mit Typ 2 Diabetes dienen. Es wird inzwischen vermutet, dass die Bestimmung von HMW-Adiponektin zusammen mit der Gesamtkonzentration von Adiponektin (und Berechnung des HMW-Adiponektin / Adiponektin-Quotienten) zukünftig eine bessere Vorhersagekraft für das Risiko einer KHK erzielen kann, als dies bisher für Adiponektin berichtet wurde (92). Studien, die einen direkten Vergleich der verschiedenen multimeren Adiponektinformen in großen Risikokollektiven für KHK untersucht hätten, sind jedoch bisher nicht veröffentlicht.

### 1.4 Fragestellung

Adiponektin wird fast ausschließlich in den Adipozyten sezerniert und stellt ein Protein mit anti-atherogenen, anti-inflammatorischen und insulinsensitivierenden Eigenschaften dar. Adiponektin zirkuliert in mindestens drei verschiedenen multimeren Komplexen, denen unterschiedliche biologische Aktivitäten nachgesagt werden.

In klinischen Studien, die die Adiponektinkonzentrationen erfassten, korrelierte Adiponektin negativ mit dem Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 und/oder einer KHK. Ferner konnte gezeigt werden, dass Adiponektin

## Einleitung

ein Marker für das Ausmaß koronarer Gefäßläsionen ist und ein Absinken der Adiponektinkonzentration war mit der Zunahme des Schweregrades einer KHK assoziiert.

Neue Erkenntnisse lassen inzwischen vermuten, dass der Anteil des HMW-Adiponektins den Hauptanteil der protektiven Effekte von Adiponektin bei Atherosklerose vermittelt. So war HMW-Adiponektin dem Adiponektin (Gesamtadiponektin) in der Prädiktion von Insulinresistenz und der Prävalenz des Metabolischen Syndroms signifikant überlegen. Nur die HMW- Form vermag an geschädigtes Endothel zu binden und die endotheliale Apoptose zu hemmen. Therapeutische Interventionen zur Erhöhung zirkulierender Adiponektinspiegel (z.B. die Behandlung mit PPAR- $\gamma$ -Agonisten oder Gewichtsreduktionsmaßnahmen) bewirken eine selektive Erhöhung der HMW- Form von Adiponektin.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die HMW-Adiponektinkonzentration und der Quotient aus HMW-Adiponektin und Adiponektin mit dem Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit bei Männern assoziiert ist. Darüber hinaus wurde der prädiktive Wert von HMW-Adiponektin und des HMW-Adiponektin/Adiponektin-Quotienten für KHK mit dem des Gesamtadiponektins verglichen. Es sollte so analysiert werden, ob die Messung von HMW-Adiponektin zukünftig einen klinischen Stellenwert in der Risikoprädiktion der KHK besitzt, die dem von Adiponektin überlegen ist.

Eine zweite unabhängige Fragestellung zielte auf eine mögliche interventionelle Erhöhung des zirkulierenden HMW-Adiponektins bei Patienten mit Typ 2 Diabetes ab. Statine sind in der Primär- und Sekundärprävention von kardialen Ereignissen bei Patienten mit Typ 2 Diabetes erfolgreich untersucht und angewandt worden. Hier zeigten sich aber auch protektive Effekte, die nicht alleine durch den cholesterinsenkenden Effekt der Statine zu erklären waren und als pleiotrope Statineffekte zusammengefasst werden. Die Senkung systemisch

## Einleitung

inflammatorischer Aktivität, charakterisiert durch einen signifikanten Abfall der CRP- Werte, ist als pleiotrop, anti-inflammatorischer Effekt der Statine bekannt. Was jedoch diesen CRP-Abfall bei Patienten mit Typ 2 Diabetes bewirkt ist noch unbekannt. Adiponektin besitzt anti-inflammatorische Fähigkeiten und zeigt eine negative Korrelation mit zirkulierenden CRP-Spiegeln in klinischen Studien bei Patienten mit Typ 2 Diabetes (32). Eine Erhöhung des Adiponektins war in früheren Studien mit einer Erniedrigung der CRP-Level im Plasma assoziiert.

Statine wirken aktivierend auf PPAR-regulierte Stoffwechselwege und üben Einflüsse auf Fettsäureaufnahme und Fettsäureoxidation aus (32; 74). Da erhöhte PPAR-Aktivität (z.B. durch die Gabe von Thiazolidindionen) einen Anstieg von HMW-Adiponektin und Adiponektin bewirkt (17), sollte in einer zweiten, unabhängigen Interventionsstudie untersucht werden, ob eine Behandlung mit 40 mg Atorvastatin (Sortis®) täglich über acht Wochen die Konzentration von Adiponektin und/oder HMW-Adiponektin bei Patienten mit Typ 2 Diabetes beeinflusst.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

Heparin	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CH3COO	E.Merk, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Synchron LX-20	Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland
Beckman LM-8 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland
VT-51.2. Rotor	Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland
Insulin-Immunoassay-Kit	CIS bio international, F91192 Gif- Sur-Yvette, Cedex, Frankreich
CRP-ELISA-Kit	Dade Behring Inc.,Cupertino, USA
Adiponektin-ELISA-Kit	B-Bridge International Inc., San Jose, USA
HMW-Adiponektin-ELISA-Kit (Adiponectin Multimeric EIA)	ALPCO Diagnostics, Salem, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Untersuchungsaufbau - Übersicht

#### *Querschnittsstudie*

Der Zusammenhang zwischen KHK, Serum-HMW-Adiponektin und dem Quotienten aus HMW-Adiponektin und der Adiponektinkonzentration wurde in einer klinischen Studie an 240 männlichen Patienten untersucht, die sich einer elektiven Koronarangiographie unterzogen.

#### *Interventionsstudie*

Der Einfluss von Atorvastatin auf die Konzentration von Adiponektin und seiner hoch-molekularen (HMW)-Isoform wurde zusätzlich an 75 Patienten mit manifestem Typ 2-Diabetes in einer 8-wöchigen, offenen, placebokontrollierten Studie untersucht.

In beiden Kollektiven wurden standardisierte Blutabnahmen jeweils morgens nach einer mindestens achtstündigen Nahrungskarenz durchgeführt.

Aus diesen Blutproben wurde die Konzentration von HMW-Adiponektin bestimmt. In vorausgegangenen Studien wurden die Konzentrationen verschiedener Lipoproteine und weitere biochemische Parameter (u. a. die Adiponektinkonzentration) gemessen.

Das Ausmaß der KHK wurde angiographisch durch Quantifizierung dreier etablierter Scores, dem Severity Score, Extent Score und Gensini Score, beschrieben.

## Materialien und Methoden

### 2.2.2 Patienten

#### *Querschnittsstudie*

An dieser Studie nahmen 240 Patienten im Alter von 28 bis 86 Jahren teil.

Alle Teilnehmer unterzogen sich einer elektiven angiographischen Untersuchung der Koronararterien an der Universität Heidelberg.

Eine manifeste KHK wurde als Extent Score > 0 definiert und bei 165 Patienten festgestellt. 75 Patienten zeigten einen unauffälligen Koronarangiographiebefund, ohne Nachweis atherosklerotischer Läsionen.

Der Body-Maß-Index (BMI) wurde durch die Formel: *Gewicht / Körpergröße<sup>2</sup>* bestimmt. Ein prävalenter arterieller Hypertonus wurde durch Blutdruckmessungen nach der Methode von Riva Rocci ermittelt. Ein Ruhewert > 140/90 mmHg und/oder eine laufende Therapie mit Antihypertonika wurde der Diagnose gleichgesetzt. Nikotinabusus und Ausmaß des Zigarettenkonsums (packyears) wurde mit der Anamnese erhoben. Zur Erfassung weiterer biochemischer Parameter, die eine Assoziation mit KHK aufweisen, wurden in früheren Studien bereits verschiedene Lipoproteinfraktionen mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt und quantifiziert. Marker der systemischen Inflammation wurden nephelometrisch (hs-CRP) und mittels ELISA (Interleukin-6, TNF- $\alpha$ ) erfasst.

Insgesamt erfüllten 80 Patienten (33,3%) die Kriterien des Metabolischen Syndroms (nach IDF-Kriterien) (109), 35 Patienten (14,6%) hatten einen manifesten Diabetes mellitus Typ 2 (nach ADA-Kriterien) (110) und 119 (49,6%) eine arterielle Hypertonie (nach WHO-Kriterien).

101 Patienten (42,1%) nahmen Medikamente zur Senkung der Blutfette (98 Patienten ein Statin, lediglich 3 Patienten ein Fibrat).

Eine laufende Therapie mit einem PPAR- $\alpha$ - oder PPAR- $\gamma$ -Agonisten, welche bekanntlich die Konzentration von Adiponektin beeinflussen (40; 104), wurde ausgeschlossen. Die Blutproben wurden unmittelbar vor der

## Materialien und Methoden

Koronarangiographie entnommen, auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Das Serum wurde aus dem Überstand aliquotiert und die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu den Analysen eingefroren.

### *Interventionsstudie*

Diese Studie wurde an einer Gruppe von 75 Typ 2-Diabetikern (41 Männer und 34 postmenopausale Frauen) in einer randomisierten, offenen und placebokontrollierten Interventionsstudie durchgeführt. In einer 2:1 Verteilung erhielten 52 Patienten 40 mg/d Atorvastatin für die Dauer von 8 Wochen, 23 Patienten erhielten ein Placebo. Ein manifester Diabetes mellitus Typ 2 wurde entsprechend den Kriterien der American Diabetes Association (Nüchtern-Plasma-Glukose  $> 126$  mg/dl; bzw. medikamentöse, anti-diabetische Therapie) festgestellt. Voraussetzung für die Teilnahme war eine kontrollierte diabetische Stoffwechsellage mit einem glykosylierten Hämoglobin  $< 12,0\%$  und einer Nüchtern-Glukose-Konzentration von  $< 12,5$  mmol/l ( $< 225$  mg/dl). Darüber hinaus durfte die laufende anti-diabetische Therapie während der Interventionsdauer nicht verändert werden und musste für mindestens 2 Monate vor Einschluss in die Studie konstant geblieben sein. Patienten, bei denen die Einnahme von Statinen kontraindiziert war (z.B. aufgrund von Erkrankungen der Leber, gemessen durch Bestimmung der Transaminasen im Serum; Patienten mit Muskelerkrankungen, gemessen durch den Wert der Kreatinkinase (CK) im Serum) wurden ausgeschlossen. Auch Patienten mit einem Nüchtern-Triglyzerid-Spiegel  $> 1000$ mg/dl, was auf sekundäre Störungen des Lipidstoffwechsels hindeutet, wurden ausgeschlossen.

Die Patienten wurden über die Indikationen einer Statintherapie und mögliche Nebenwirkungen aufgeklärt. Es wurde die Einnahme von 40 mg Atorvastatin (n=52) oder Placebo (n=23) täglich über einen Zeitraum von acht Wochen angeordnet. Die Teilnehmer wurden aufgefordert ihre vorherige Medikation, Diät und körperliche Aktivität wie gewohnt beizubehalten.

## Materialien und Methoden

Nüchtern-Blutabnahmen wurden nach mindestens 10-stündiger Nüchternphase jeweils morgens unmittelbar vor Beginn der Statintherapie und nochmals am Ende der achtwöchigen Therapie durchgeführt.

Die Studienprotokolle wurden von der Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigt und jeder Patient gab nach ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung.

### 2.3 Biochemische Analysen

#### 2.3.1 Bestimmung der Plasmakonzentration von Adiponektin mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der Adiponektinkonzentration erfolgte mittels eines ELISAs der Firma B-Bridge International Inc., San Jose (USA), entsprechend des vorgegebenen Protokolls:

- 10 µl Patienten-Serum werden jeweils auf den Faktor 5100 verdünnt und mit den Standardlösungen, die unterschiedliche Adiponektinkonzentrationen beinhalten, auf eine „96-well“ Platte gegeben. Das „well“ ist mit einem Anti-Adiponektin-Antikörper beschichtet, woran in der vorgegebenen Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur das Adiponektin der Proben bindet (1. Reaktion).
- Nach Abwaschen des übrigen, nicht gebundenen Serums wird ein weiterer polyklonaler Anti-Adiponektin-Antikörper vom Hasen auf die Platte gegeben, der nun an das Adiponektin der 1. Reaktion bindet (2. Reaktion).
- Folglich findet ein weiterer Waschvorgang statt. Im Anschluss daran wird ein Konjugat aus horseradish peroxidase (HRP) und Antikörper gegen IgG des Hasen hinzugegeben und erneut inkubiert (3.

Reaktion). Dieser Antikörper detektiert den gebundenen Anti-Adiponektin-Antikörper der 2. Reaktion.

- Zum Abschluss findet ein weiterer Waschvorgang statt und das Substrat für die Peroxidase wird zugegeben. Durch nachfolgende enzymatische Reaktion findet eine Farbenstehung statt, die nach 15 min durch eine reaktionsstoppende Lösung beendet wird.
- Diese Farbintensität kann im Folgenden bei 450 nm photometrisch gemessen werden. Auch bei den Standardlösungen ist eine Absorption zu messen, mit der eine Standardkurve erstellt werden kann, aus welcher nun die Adiponektinkonzentrationen abgelesen werden können.

### 2.3.2 Bestimmung der Plasmakonzentration von HMW-Adiponektin mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der HMW-Adiponektinkonzentration erfolgte mittels eines ELISAs der Firma ALPO Diagnostics, Salem, USA entsprechend des vorgegebenen Protokolls:

- Jeweils 10 µl des Patienten-Serums werden gemeinsam mit einer Protease (Proteinase K) in 1,5 ml -Tubes gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Protease erfüllt die Aufgabe alle isomeren Formen vom Gesamtadiponektin (ausgenommen der HMW-Form) selektiv durch proteolytische Spaltung zu verdauen (20). Es verbleibt nur das HMW-Adiponektin.
- Hiernach werden 400 µl eines Puffers hinzu gegeben, um eine Verdünnung von 1:51 zu erhalten. Anschließend werden 10 µl dieses Ansatzes mit 1,0 ml eines Verdünnungsphosphatpuffers erweitert und eine endgültige Verdünnung von 1:5151 erreicht.
- Nun werden 50 µl dieser verdünnten Probe zusammen mit den vorgegebenen Standardlösungen zur Errechnung der Referenzkurve auf eine „96-well“ Platte gegeben und für eine Stunde bei

## Materialien und Methoden

Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wird das nach dem proteolytischen Verdau verbliebene HMW-Adiponektin an das mit humanen Anti-Adiponektin-Antikörpern beschichtet „well“ gebunden (1. Reaktion).

- Nach mehrmaligen Waschvorgängen werden 50 µl eines monoklonalen Anti-Adiponektin-Antikörpers, gebunden an Biotin, hinzugegeben und der Ansatz erneut für eine Stunde unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Dieser Antikörper detektiert das gebundene HMW-Adiponektin der 1. Reaktion (2. Reaktion). Nach erneutem Waschen wird das Gemisch mit einem Konjugat aus horseradish peroxidase (HRP) und Streptavidin versetzt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper bindet an das Anti-Adiponektin der 2. Reaktion (3. Reaktion).
- Zuletzt werden nach einem letzten Waschvorgang 50 µl des Substrats für die Reaktion mit der Peroxidase hinzugegeben und unter Lichtabschirmung für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wird die Farbentstehung durch Hinzugabe von 50 µl einer reaktionsstoppenden Lösung beendet.
- Nun kann die Farbintensität photometrisch durch Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt werden. Aus den Absorptionen der Standardlösungen lässt sich eine Standardkurve ermitteln und unter Berücksichtigung der Standardkurve die HMW-Adiponektinkonzentrationen aus den verschiedenen gemessenen Intensitäten ermitteln.

### 2.3.3 Ratio

Zur Beschreibung des Verhältnisses der Konzentrationen von HMW-Adiponektin zu Adiponektin im Serum der Patienten wurde die so genannte „Ratio“ mit folgender Formel berechnet:

*HMW-Adiponektin / Adiponektin*

2.3.4 Messung von Lipiden und Lipoproteinen

Low density lipoprotein (LDL)-Cholesterin und VLDL-Cholesterin wurden mittels Ultrazentrifugation in einer Beckmann LM-8 Ultrazentrifuge in 100 µl Proben durch einen VT-51.2. Rotor (Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland) in vorausgegangenen Studien bereits separiert.

Anschließend wurde die Konzentration von Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyzeriden enzymatisch in einem Synchron LX-20 (Beckman Coulter GmbH, München, Deutschland) bestimmt.

Der „Atherogene Index“ wurde mit folgender Formel berechnet:

$$(Gesamtcholesterin - HDL-Cholesterin) / HDL-Cholesterin$$

2.3.5 Bestimmung der Insulinresistenz

Die Insulinresistenz wurde mittels einer Methode von Metthews, die erstmals 1985 beschrieben wurde, durch das so genannte Homeostase Model Assessment (HOMA) (61) bestimmt.

Hierbei wird ein indirekter Insulinresistenz-Score (HOMA-IR) berechnet, der in zahlreichen klinischen Studien eng mit dem Ausmaß der Insulinsensitivität in aufwendigen Clamp-Studien korrelierte.

$$HOMA-IR = [ Nüchtern-Glukose (mmol/l) \times Nüchtern-Insulin (\mu U/l) ] / 22,5$$

Hohe HOMA-IR Werte stehen für eine niedrige Insulinsensitivität, während niedrige Werte einer guten Insulinsensitivität entsprechen.

### 2.3.6 Erfassung von Nüchtern-Glukose, Plasmainsulinspiegel, CRP-und IL-6 Spiegel

Die Nüchtern-Glukose-Konzentration wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Heidelberg, Innere Medizin nach einer Glukose-oxidase-Methode bestimmt. Die Plasmainsulinspiegel wurden mittels ELISA (CIS bio international, F91192 Gif-Sur-Yvette Cedex / Frankreich) gemessen.

Die Serumkonzentrationen von CRP wurden in einem hoch sensitiven Assay (hs-CRP) mittels Nephelometrie gemessen (Dade Behring Inc., Cuperino, USA). Die Serumkonzentration von Interleukin (IL-6) und TNF- $\alpha$  wurden durch hoch sensitive ELISAs (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

## 2.4 Koronarangiographie

Die Auswertung der Koronarangiographie wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, die bezüglich Risikofaktoren und Serumadiponektinspiegel der Patienten verblindet waren.

Sechs Standardprojektionen wurden ausgewählt, um eine optimale Darstellung der atherosklerotischen Veränderungen der Koronargefäße zu erzielen. Das Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit wurde durch drei etablierte Scores erfasst: 1) *Severity-Score*, 2) *Extent-Score* und 3) *Gensini-Score*.

### 1) *Severity-Score*

Der Severity-Score ist als einfacher klinischer Score in der Praxis leicht anwendbar. Er beschreibt die Anzahl der koronaren Läsionen in ein, zwei oder drei Herzkranzgefäßen, entsprechend dem Vorliegen einer koronaren 1-, 2- oder 3- Gefäßerkrankung. Als koronare Läsion wird das Vorliegen einer

## Materialien und Methoden

50%igen Stenose, bzw. eine 50%ige Reduktion des luminalen Durchmessers bezeichnet (2; 97).

### 2) *Gensini-Score*

Der Gensini-Score bietet eine genauere Klassifizierung des Stenosegrades der Herzkranzgefäße: Anhand verschiedener Punktsysteme wird eine Quantifizierung des koronaren Gefäßschadens vorgenommen: „1“ bei einer Stenose von 1-25%, mit „2“ bei einer Stenose von 26-50%, mit „4“ bei 51-75%, „8“ bei 76-90% und „16“ bei einer Stenose von 91-99%. „32“ entspricht dem eines totalen Verschlusses (97).

Der so ermittelte Score wird anschließend noch mit einem Faktor, der die Lage und damit auch indirekt die klinische Bedeutsamkeit des Segments, beschreibt, multipliziert.

### 3) *Extent-Score*

Der Extent-Score kann Werte einer Spanne von 0 bis 100 Punkten annehmen. Mit dem Extent-Score können kleinste atherosklerotische Wandunregelmäßigkeiten beschrieben werden, die sich in bestimmten Segmenten der Herzkranzgefäße befinden. Kommen Wandveränderungen vor, so wird dies mit einem für dieses Segment vorgegebenen Punktwert erfasst.

5 Punkte für den linken Hauptstamm, 20 für den linken vorderen deszendierenden Ast, 10 Punkte für den diagonalen Hauptast, 5 für den ersten septalen Ast, 20 für die linke Arteria circumflexa, 10 für die marginalen und posterolateralen Gefäße, 20 Punkte für die rechte Koronararterie und 10 für den rechten hinteren deszendierenden Ast (97).

Die Werte der einzelnen Segmente der Koronararterien werden anschließend addiert und die Gesamtsumme festgehalten. Dieser aufwendige Score unterscheidet sich von den ersten beiden dahingehend, dass nicht nur

stenotische Gefäßabschnitte erfasst werden, sondern auch frühe Prozesse der koronaren Atherosklerose mit in die Wertung aufgenommen werden. Der Extent Score korrelierte in früheren Untersuchungen besser mit dem individuellen Risikoprofil der untersuchten Patienten, als die beiden ersten Scores (25).

### 2.5 Atorvastatin (Sortis®)

Atorvastatin ist ein Wirkstoff der Klasse der 3-Hydroxy-1-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)- Reduktasehemmer, die auch als Cholesterin-Synthese (CSE)- Hemmer oder kurz Statine bezeichnet werden.

Atorvastatin bewirkt eine kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, das wichtigste Enzym in der endogenen Cholesterinbiosynthese. In der klinischen Anwendung erzielen CSE-Hemmer nicht nur eine Abnahme des Gesamtcholesterins, sondern auch eine Reduzierung des Plasma-LDL um ca. 40%, eine Erniedrigung der Triglyzeride um 20% und ein Ansteigen des HDL um ca. 2-10%. Darüber hinaus kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulation der LDL-Rezeptoren in der Leber und auch der Peripherie (21; 32).

Mögliche Nebenwirkungen können Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden, Transaminasenanstieg, CK-Erhöhung und vor allem eine Myopathie mit Rhabdomyolyse, Myoglobinämie und akutem Nierenversagen sein (93).

Indikationen für die Behandlung mit einem CSE-Hemmer sind bis heute die Hypercholesterinämie und die Hyperlipidämie mit vorherrschender Hypercholesterinämie.

Desweiteren gibt es Hinweise, dass eine sofortige Gabe von CSE-Hemmern beim akuten Koronarsyndrom die Sterblichkeit reduziert. Der günstige Effekt basiert hier wohlmöglich nicht einzig auf der Lipidsenkung, sondern es kommt darüber hinaus zu einer signifikant reduzierten Thrombozytenaktivität. Zusätzlich scheinen so genannte pleiotrope

Statineffekte über anti-inflammatorische und plaque-stabilisierende Mechanismen günstige Effekte auszuüben (21).

Kürzlich konnte in Studien eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR- $\gamma$  unter CSE-Hemmern beschrieben werden (32). „Peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen, die in Fettsäureaufnahme- und oxidation, Lipidstoffwechsel und Inflammation involviert sind, regulieren (74). Die Expression des Adiponektin-Gens unterliegt einer positiven Kontrolle von PPAR- $\gamma$  und so führt eine Behandlung mit PPAR- $\gamma$ -Agonisten zu einer signifikanten Erhöhung der zirkulierenden Adiponektinspiegel (40; 96). Eine mögliche Assoziation zwischen einer CSE-Hemmertherapie und Veränderungen der Adiponektinkonzentration könnte über die Beeinflussung von PPAR- $\gamma$ - abhängigen Stoffwechselwegen vermittelt werden. Zusätzlich zur Adiponektinkonzentration wurde in dieser Studie daher auch untersucht, ob unter der Therapie mit 40 mg/d Atorvastatin Veränderungen in der multimeren Verteilung der Adiponektinisoformen zu beobachten waren.

## 2.6 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit SPSS für Windows, Ausgabe 11.0 durchgeführt:

### *Querschnittsstudie*

Normalverteilte Parameter werden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Nicht-normalverteilte Parameter (u. a. Adiponektin, HMW-Adiponektin und die HMW-Adiponektin / Adiponektin Ratio) werden als Median präsentiert und für kombinierte Analysen log-transformiert, um eine Normalverteilung zu erzielen. Bivariate Korrelationen zwischen den Adiponektinvariablen und kardiovaskulären Risikofaktoren wurden mit Hilfe des Spearman Koeffizienten ermittelt. Die Adjustierung für relevante

## Materialien und Methoden

anthropometrische und laborchemische Co-Variablen in der Analyse zwischen Adiponektinvariablen und KHK-Scores erfolgte mittels der partial adjustierten Korrelationsanalyse. Zur Kalkulation des relativen Risikos [Odds ratio (OR)] wurden die Patienten zu gleichen Anteilen in Quartile eingeteilt (n=60). Die Einteilung erfolgte nach der Gesamtadiponektin- und der HMW-Adiponektinkonzentration bzw. dem Wert der Ratio. Die interquartilen cuttoff-Werte für Gesamtadiponektin lagen bei 2,50, 4,29 und 7,1 µg/ml: Kategorie 1, < 2,50 µg/ml; 2,50 µg/ml ≤ Kategorie 2 < 4,29 µg/ml; 4,29 µg/ml ≤ Kategorie 3 < 7,1 µg/ml; und Kategorie 4, ≥ 7,1 µg/ml. Die für HMW-Adiponektin lagen bei 0,95, 1,70 und 2,95 µg/ml: Kategorie 1, < 0,95 µg/ml; 0,95 µg/ml ≤ Kategorie 2 < 1,70 µg/ml; 1,70 µg/ml ≤ Kategorie 3 < 2,95 µg/ml; und Kategorie 4, ≥ 2,95 µg/ml. Cutoff-Werte für die HMW/Adiponektin Ratio lagen bei 0,31, 0,38 und 0,52: Kategorie 1, < 0,31; 0,31 ≤ Kategorie 2 < 0,38; 0,38 ≤ Kategorie 3 < 0,52; und Kategorie 4, > 0,52.

Für Subgruppenanalysen wurden die Patienten in Quartile bzw. Quintile entsprechend des Ausmaßes der KHK im jeweiligen angiographischen Score eingeteilt [Severity-Score (Quartile): keine KHK 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung; Gensini-Score (Quartile): <25, 25-50, 50-75, > 75. Perzentile; Extent-Score (Quintile): < 20, 20-40, 41-60, 61-80, > 80]. Die Unterschiede der Plasmakonzentration für HMW-Adiponektin und der Ratio zwischen den Quartilen bzw. Quintilen wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) getestet. Die Unabhängigkeit des Einflusses von HMW-Adiponektin und der Ratio auf das angiographische Ausmaß der KHK wurde darüber hinaus mit Hilfe einer multivariablen Analyse nach dem linearen Regressionsmodell untersucht. So wurde der relative Beitrag verschiedener unabhängiger Faktoren auf einen abhängigen Faktor, in diesem Fall der Wert im Extent-Score, quantifiziert. Als unabhängige Faktoren wurde Alter, BMI, Plasmatriglyzeride, HDL, LDL, packyears, hs-CRP, Interleukin-6, Statintherapie sowie HMW-Adiponektin oder die Ratio eingeschlossen. ROC-

## Materialien und Methoden

Kurven wurden aufgezeichnet und die area under the curve (AUC) berechnet, um den prädiktiven Wert von HMW-Adiponektin und der Ratio für 1) die Existenz einer manifesten KHK (Severity-Score > 0) und 2) die Existenz einer schweren KHK (Extent-Score > 75. Perzentile) zu vergleichen.

### *Interventionsstudie*

Die Unterschiede für Gesamtadiponektin, HMW-Adiponektin und der HMW / Adiponektin Ratio, sowie weiteren Variablen vor Beginn und nach Abschluss der Interventionsstudie wurden mittels paired  $t$  test für normalverteilte Werte oder dem Wilcoxon matched-pair-signed-test für nicht-normalverteilte Werte analysiert.

In allen Analysen wurde ein p-Wert von 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### *Querschnittsstudie*

#### 3.1 Patientenkollektiv

In **Tabelle 1** sind klinische und biochemische Charakteristika der 240 untersuchten Probanden zum Zeitpunkt unmittelbar vor der elektiven Koronarangiographie zusammengefasst. Die Daten sind jeweils als Minimum, Maximum, Median, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

**Tabelle 1:** Klinische und biochemische Charakteristika des Studienkollektivs

	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	Standardabweichung
Alter (Jahre)	28	86	62	61	+ /-10,2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,7	40,6	27,4	27,5	+/- 3,4
Cholesterin(mg/dl)	113	450	200	204,8	+/- 46,2
Triglyzeride(mg/dl)*	14	1393	121	149,7	+/- 118,0
VLDL (mg/dl)*	3	377	19	25,5	+/- 28,5
LDL (mg/dl)	69	390	135	139,6	+/- 38,4
HDL (mg/dl)	15	107	38	40,2	+/- 11,6
Atherogene Index	2,1	29,9	5,1	5,5	+/- 2,4
Packyears*	0	100	10	17,3	+/- 21,9
Kreatinin (mg/dl)	0,4	2,3	1	1,0	+/- 0,2
hs-CRP (mg/l)*	0,2	42,9	1,6	3,9	+/- 6,9
Interleukin-6 (pg/ml)*	0,5	74,2	2,3	4,6	+/- 7,2
HOMA-IR*	0,7	29,4	4,4	5,2	+/- 4,2
Adiponektin(µg/ml)*	0,4	23,7	4,3	5,6	+/- 4,2
HMW-Adiponektin (µg/ml)*	0,1	13,7	1,7	2,3	+/- 2,0
Ratio*	0,1	1	0,4	0,4	+/- 0,2

\*: Parameter ohne Normalverteilung

### 3.2 Assoziationen zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin, Ratio und klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren

In **Tabelle 2** sind die Beziehungen zwischen den Plasmakonzentrationen von Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio und klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren zusammengefasst. Dargestellt ist der Spearman Korrelationskoeffizient für folgende Faktoren: Alter, BMI (als Marker für Adipositas), Dyslipidämie (Cholesterin, HDL, LDL, VLDL, TG), Rauchen (packyears), Insulinresistenz (HOMA-IR), systemische inflammatorische Aktivität (IL-6, hs-CRP), sowie eine positiven Anamnese für Hypertonie und Diabetes mellitus.

**Tabelle 2:** Spearman Korrelationskoeffizient für Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren

	HMW-Adiponektin		Adiponektin		Ratio	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Alter	0,129	<b>0,044</b>	0,197	<b>0,002</b>	-0,021	0,747
BMI	-0,312	<b>&lt;0,001</b>	-0,249	<b>&lt;0,001</b>	-0,182	<b>0,004</b>
Cholesterin	0,038	0,553	0,076	0,231	-0,057	0,379
HDL	0,419	<b>&lt;0,001</b>	0,331	<b>&lt;0,001</b>	0,213	<b>&lt;0,001</b>
LDL	-0,007	0,920	0,042	0,515	-0,066	0,317
VLDL	-0,285	<b>&lt;0,001</b>	-0,221	<b>&lt;0,001</b>	-0,149	<b>0,020</b>
Triglyzeride	-0,273	<b>&lt;0,001</b>	-0,198	<b>0,002</b>	-0,169	<b>0,009</b>
Atherogener Index	-0,352	<b>&lt;0,001</b>	-0,268	<b>&lt;0,001</b>	-0,192	<b>0,003</b>
Packyears	-0,201	<b>0,002</b>	-0,150	<b>0,018</b>	-0,174	<b>0,007</b>
HOMA-IR	-0,333	<b>&lt;0,001</b>	-0,236	<b>0,001</b>	-0,275	<b>&lt;0,001</b>
hs-CRP	-0,236	<b>&lt;0,001</b>	-0,227	<b>&lt;0,001</b>	0,001	0,983
Interleukin-6	-0,022	0,736	-0,078	0,225	0,146	<b>0,024</b>
Diabetes mellitus*	-0,101	0,119	-0,096	0,140	-0,028	0,664
Hypertonus*	-0,057	0,375	-0,007	0,917	-0,061	0,342

Statistisch signifikante positive oder negative Korrelationen (p-value < 0,05) sind fett markiert

\* kategoriale Variablen

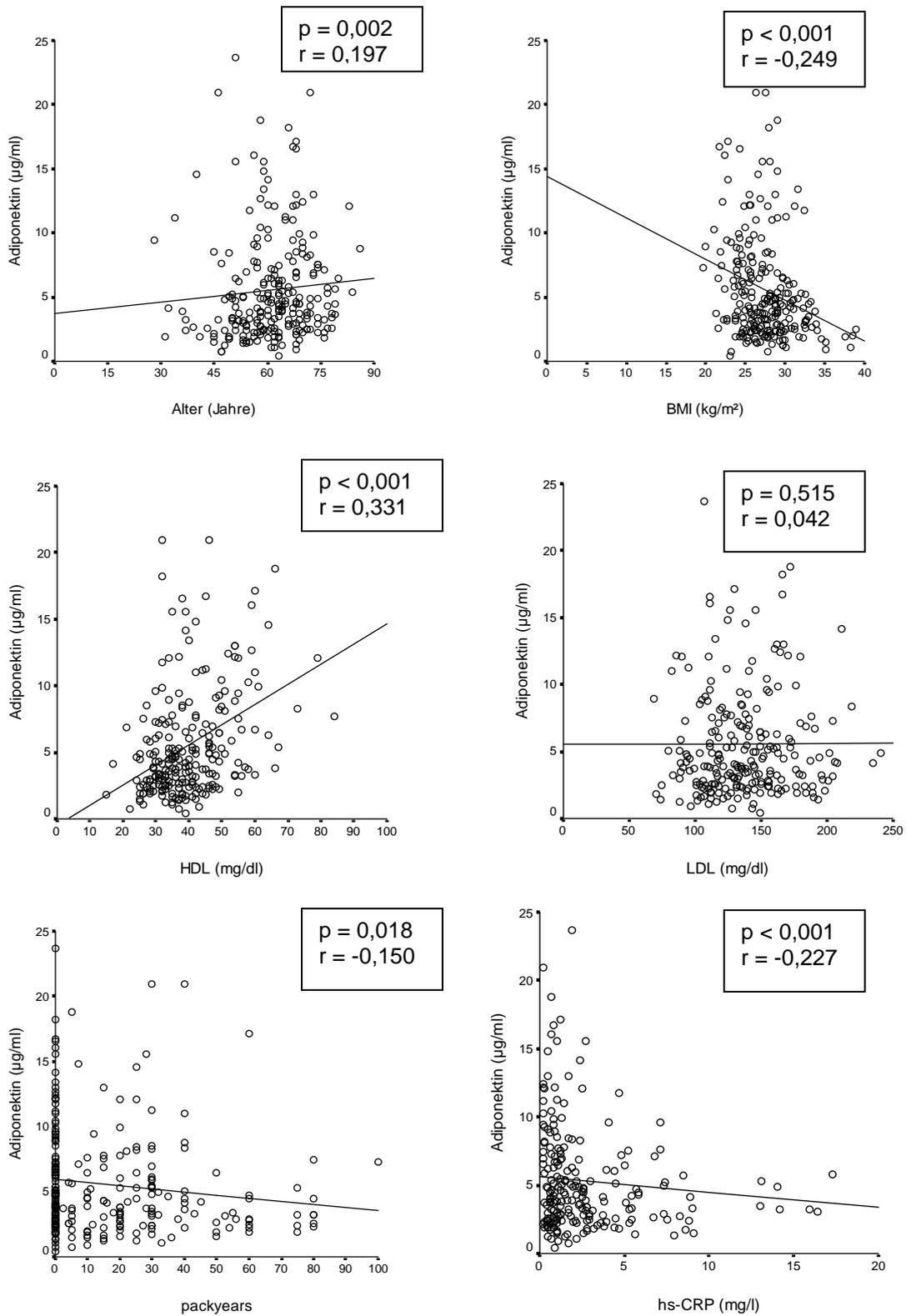
## Ergebnisse

Adiponektin, HMW-Adiponektin und die Ratio zeigen signifikante Assoziationen mit etablierten, klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren: So ergeben sich statistisch signifikant negative Korrelationen zwischen Adiponektin und BMI, hs-CRP, packyears, HOMA-IR sowie Markern des Lipidmetabolismus (Triglyzeride, VLDL, Atherogener Index). Vergleichbar negative Assoziationen finden sich zwischen HMW-Adiponektin und BMI, hs-CRP, packyears, HOMA-IR und den Lipidparametern (Triglyzeride, VLDL, Atherogener Index). Signifikant positiv ist die Korrelation zwischen beiden, Adiponektin und HMW-Adiponektin, und HDL-Cholesterin. Für die Ratio ergeben sich signifikante Korrelationen mit HDL-Cholesterin und Interleukin-6 (positiv), sowie BMI, packyears, HOMA-IR und den Lipidparametern: Triglyzeride, VLDL und Atherogener Index (negativ).

Die signifikanten Assoziationen zwischen Adiponektin und den ausgewählten Variablen: Alter, BMI, HDL, LDL, packyears und hs-CRP sind in **Abbildung 1a** dargestellt. **Abbildung 1b und 1c** zeigen entsprechende Assoziationen zwischen HMW-Adiponektin (**Abb.1b**) und der Ratio (**Abb.1c**) und diesen Variablen.

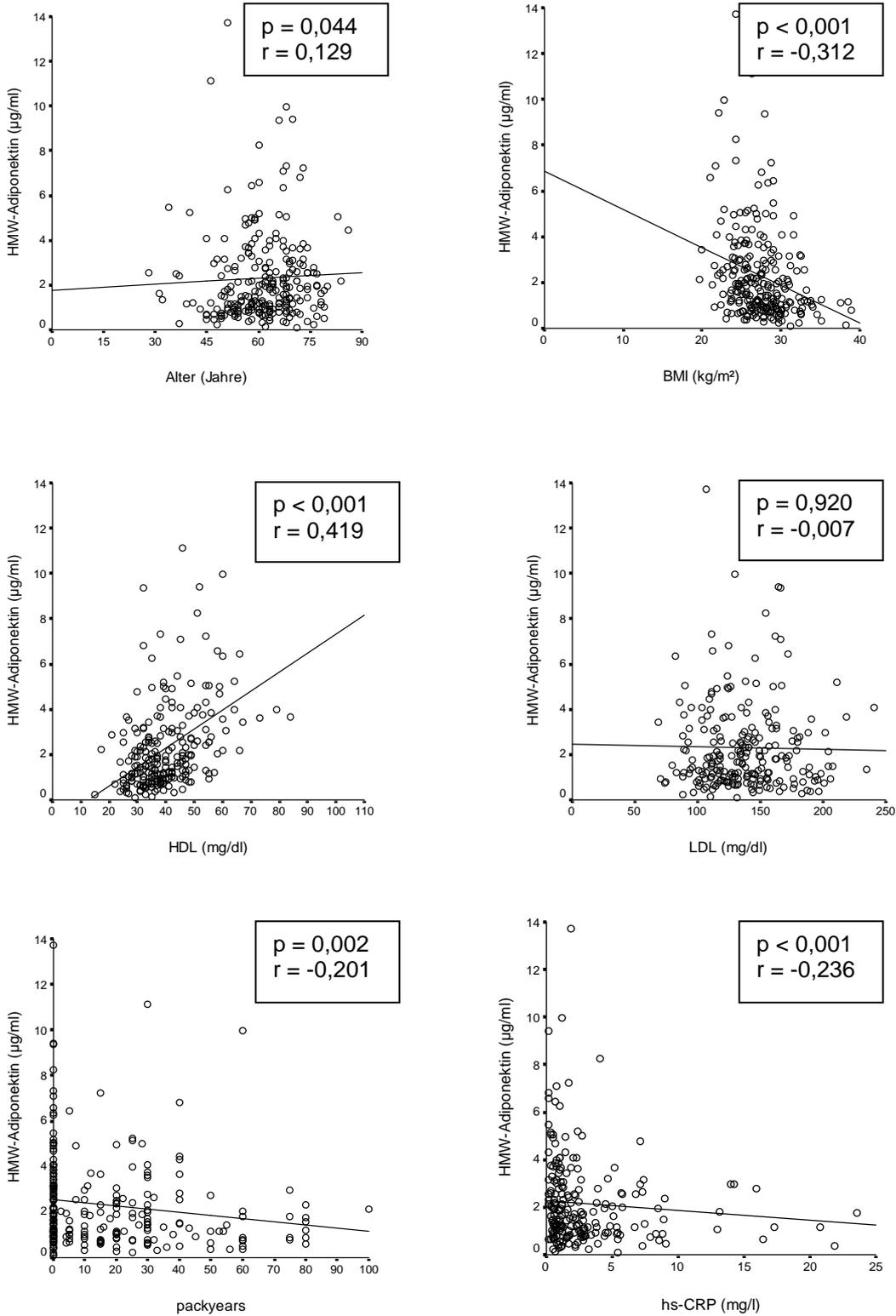
# Ergebnisse

**Abbildung 1a:** Korrelationen zwischen Adiponektin und ausgewählten Risikofaktoren



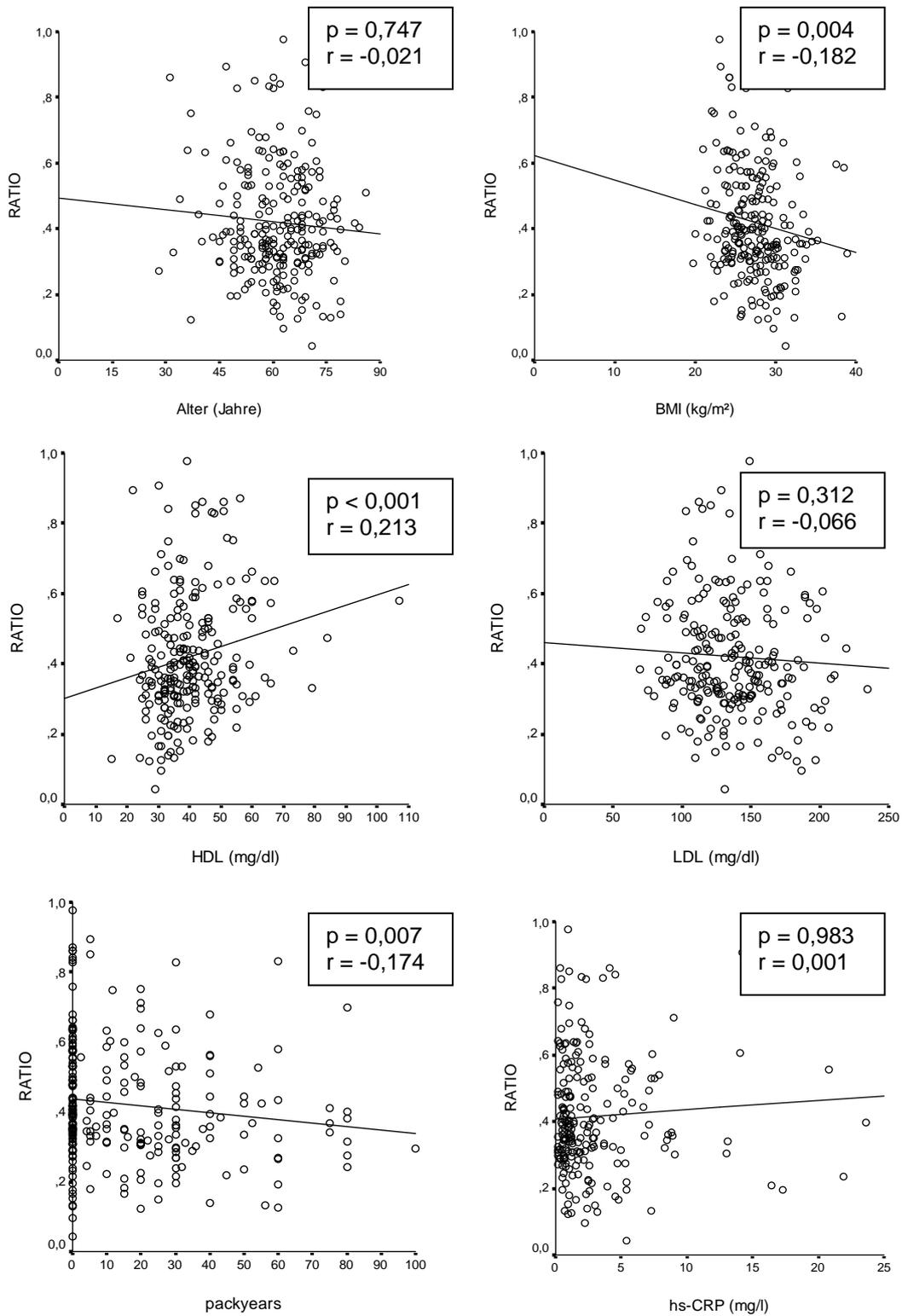
# Ergebnisse

**Abbildung 1b:** Korrelationen zwischen HMW-Adiponektin und ausgewählten Risikofaktoren



# Ergebnisse

**Abbildung 1c:** Korrelationen zwischen der Ratio und ausgewählten Risikofaktoren



### 3.3 Adiponektin, HMW-Adiponektin, Ratio und der Schweregrad der Koronaren Herzerkrankung

#### 3.3.1 Beziehung zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio und dem angiographischen Schweregrad einer prävalenten KHK

**Tabelle 3a** zeigt die Korrelationen zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin, der Ratio mit dem angiographischen Schweregrad der KHK an Hand der klinischen Einteilung in 3 verschiedene Scores zur Erfassung atherosklerotischer Wandveränderungen der Koronararterien.

**Tabelle 3a:** Korrelationen\* zwischen HMW-Adiponektin, Adiponektin und der Ratio mit 3 angiographischen KHK-Scores (Extent-Score, Gensini-Score, Severity-Score)

	HMW-Adiponektin		Adiponektin		Ratio	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
Extent-Score	-0,392	<0,001	-0,183	0,004	-0,487	<0,001
Gensini-Score	-0,350	<0,001	-0,167	0,009	-0,468	<0,001
Severity-Score	-0,400	<0,001	-0,222	<0,001	-0,457	<0,001

\*: Nonparametrische bivariate Korrelationen nach Spearman

Es ergibt sich eine signifikante negative Korrelation für Adiponektin HMW-Adiponektin und der Ratio für alle drei ermittelten KHK-Scores (**Tabelle 3a**). Diese Korrelationen bleiben auch nach Anpassung für Alter und BMI (**Tabelle 3b**), sowie der weiteren Adjustierungen für klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Rauchen, LDL, Hypertonie) statistisch signifikant (**Tabelle 3c**).

## Ergebnisse

**Tabelle 3b:** Korrelationen\* zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit 3 angiographischen KHK-Scores nach Anpassung für BMI und Alter

	HMW-Adiponektin		Adiponektin		Ratio	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
Extent-Score	-0,369	< 0,001	-0,190	0,003	-0,424	<0,001
Gensini-Score	-0,270	< 0,001	-0,130	0,046	-0,355	<0,001
Severity-Score	-0,389	< 0,001	-0,217	0,001	-0,340	<0,001

\*: Partial adjustierte Korrelationen

**Tabelle 3c:** Korrelationen\* zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit 3 angiographischen KHK-Scores nach zusätzlicher Anpassung für klassische Risikofaktoren

	HMW-Adiponektin		Adiponektin		Ratio	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
Extent-Score	-0,353	< 0,001	-0,174	0,009	-0,415	<0,001
Gensini-Score	-0,251	< 0,001	-0,112	0,090	-0,340	<0,001
Severity-Score	-0,377	< 0,001	-0,203	0,002	-0,385	<0,001

\*: Partial adjustierte Korrelationen

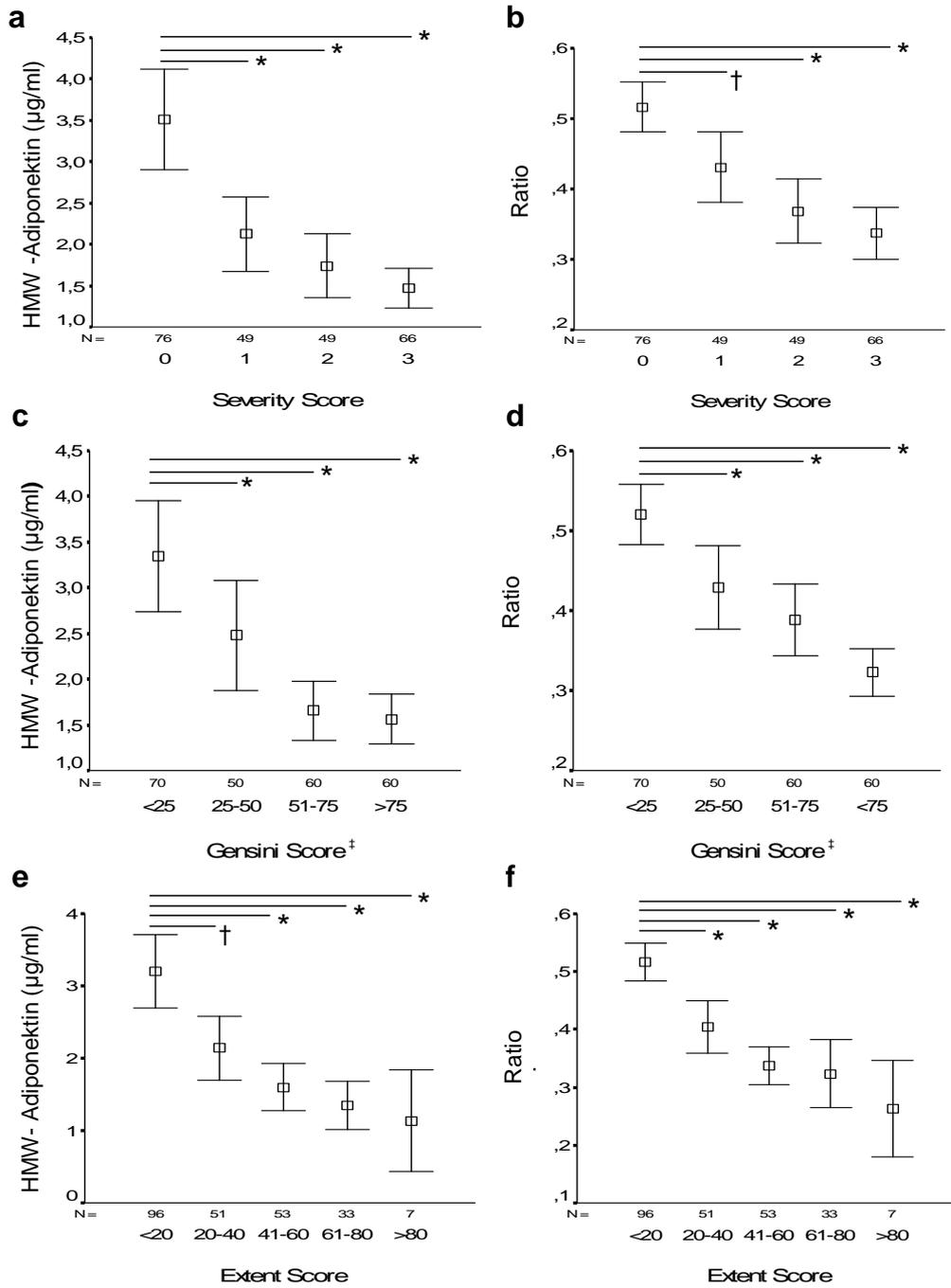
### 3.3.2 Graphische Darstellung der beobachteten Korrelationen zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit dem angiographischen Schweregrad einer prävalenten KHK

Die **Abbildungen 2 a-f** zeigen Assoziationen zwischen HMW-Adiponektin und der Ratio und dem Ausmaß der Koronaren Herzerkrankung an Hand der 3 ermittelten angiographischen Scores: Severity Score, Gensini Score und Extent Score. Zur besseren Übersicht wurden die Patienten entsprechend ihrer KHK-Scores in Subgruppen unterteilt: Severity Score: 0, 1, 2, 3; Gensini Score: <25, 25-50, 51-75, >75. Perzentile; Extent Score: <20, 20-40, 41-60, 61-80, >80. Die statistische Signifikanz zwischen HMW-Adiponektin und der Ratio mit dem Schweregrad der koronaren Atherosklerose kann so mittels ANOVA-Analyse über alle Subgruppen ausgewertet werden. Unterschiede zwischen zwei einzelnen Subgruppen werden durch Analyse mittels „Independent-Samples-T-Test“ durchgeführt.

**Abbildung 2:** Assoziation von HMW-Adiponektin und der Ratio mit dem angiographischen Ausmaß einer Koronaren Herzerkrankung in drei verschiedenen Scores

**Legende:** Das offene Quadrat symbolisiert den Median und die vertikalen Linien den 95% Konfidenzintervall (KI). Die Anzahl der Patienten/Subgruppen ist als Zahl über dem jeweiligen angiographischen Score angegeben. \*:  $p < 0,001$ ; †:  $p < 0,005$  (Mann-Whitney  $U$  test). ‡: Die Einteilung des Gensini Scores entspricht Perzentilen.

Abbildung 2:



## Ergebnisse

Verglichen mit Patienten, die keine angiographisch erfassbare Koronare Herzerkrankung aufweisen (Severity Score = 0), finden sich bei Patienten mit 1-, 2-, oder 3- Gefäßerkrankung (*Severity-Klassifikation*) signifikant niedrigere HMW-Adiponektinkonzentrationen (**Abb. 2a**) und eine niedrigere Ratio (**Abb. 2b**).

Ein kontinuierlicher Abfall der HMW-Adiponektinkonzentration (**Abb. 2c**) und auch der Ratio (**Abb. 2d**) ist mit einer signifikanten Zunahme des Stenosegrades in den Koronarien (*Gensini-Klassifikation*) der Patienten assoziiert. Schließlich ist auch der kontinuierliche Abfall der HMW-Adiponektinkonzentration (**Abb. 2e**) und der Ratio (**Abb. 2f**) signifikant mit einem erhöhten Ausmaß atherosklerotischer Wandunregelmäßigkeiten der Patienten im *Extent-Score* assoziiert.

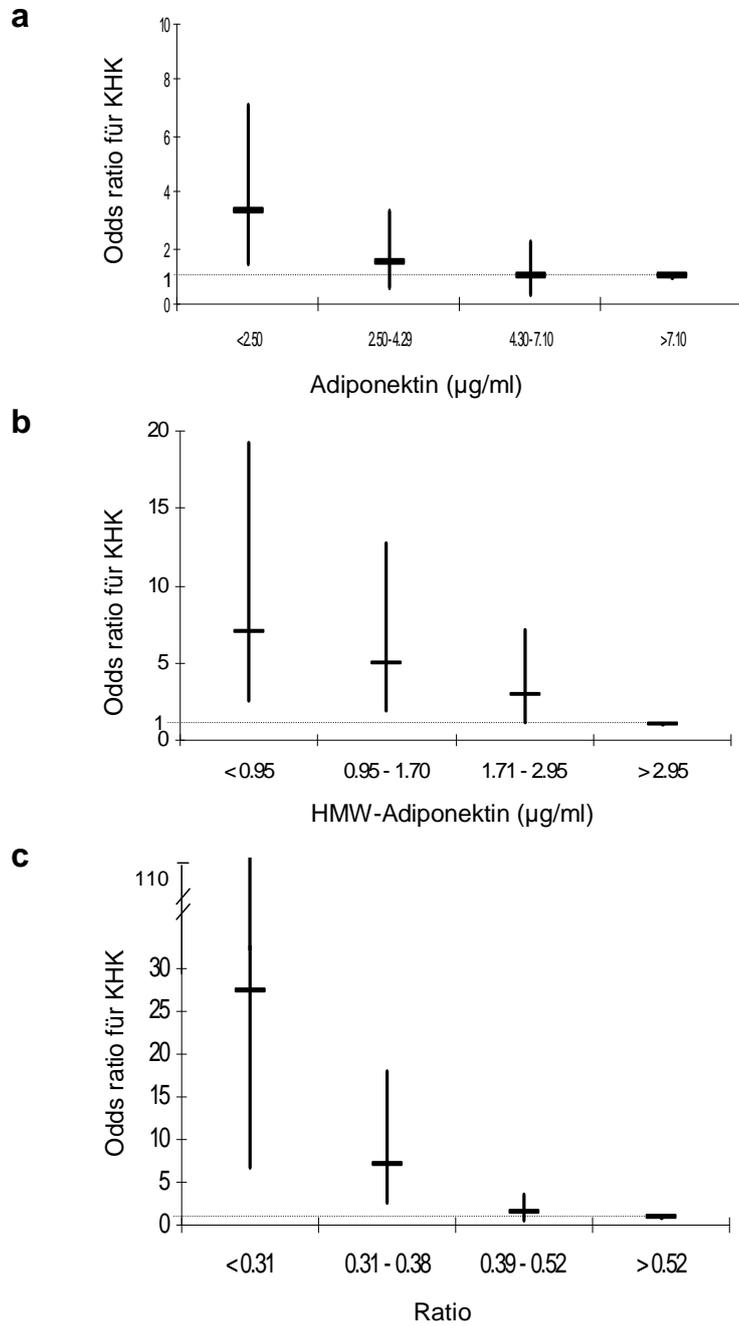
### 3.4 HMW-Adiponektin, Ratio und das relative Risiko für eine prävalente Koronare Herzerkrankung

**Abbildungen 3a-c** zeigen den prädiktiven Wert von Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio für das relative Risiko (Odds Ratio) einer manifesten Koronaren Herzerkrankung.

Für eine anschauliche Darstellung und zur Übertragung in mögliche klinische Grenzwerte wurden die Patienten entsprechend ihrer Konzentrationen für Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio in Quartile unterteilt, die nach aufsteigenden Konzentrationen als Quartile 1-4 bezeichnet werden (die Patienten mit der höchsten Konzentration finden sich in Quartile 4). Jede Quartile besteht aus jeweils sechzig Patienten. Die Gruppe mit den höchsten Werten (Quartile 4: Adiponektin > 7.1 µg/ml; HMW > 2.95 µg/ml; Ratio > 0,52) wird in der binären logistischen Regression mit dem relativen Risiko von 1,0 (Odds Ratio = 1,0) gleichgesetzt.

# Ergebnisse

## Abbildung 3:



## Ergebnisse

**Abbildung 3a** zeigt, dass eine Abnahme der Adiponektinkonzentration über den Quartilen mit einer Zunahme des relativen Risikos (RR) assoziiert ist. So ist das RR bei Patienten mit den niedrigsten Adiponektinkonzentrationen (Quartile 1: Adiponektin  $< 2,50\mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zu Patienten in der höchsten Adiponektinquartile (Adiponektin  $> 7,1\mu\text{g/ml}$ ) signifikant um den Faktor 3,252 (95% Konfidenzintervall 1,499-7,057;  $p < 0,001$ ) erhöht. Es besteht eine Tendenz zu einem erhöhten Risiko für Patienten in Quartile 2 (Adiponektin:  $2,50-4,29\mu\text{g/ml}$ ; RR: 1,483; 95% KI: 0,663-3,317;  $p = 0,08$ ) und Quartile 3 (Adiponektin:  $4,3-7,1 \mu\text{g/ml}$ ; RR: 0,959; 95%KI: 0,413-2,226;  $p = 0,12$ ) im Vergleich zu den Patienten in der höchsten Adiponektinquartile. Allerdings ist zu sehen, dass es Überschneidungen des RR in den 95% Konfidenzintervallen gibt und der Unterschied ist daher nicht statistisch signifikant.

**Abbildung 3b** zeigt, dass eine Abnahme des HMW-Adiponektin über den Quartilen mit einer Zunahme des relativen Risikos (RR) assoziiert ist. So ist das RR bei Patienten mit den niedrigsten HMW-Adiponektinkonzentrationen (Quartile 1: HMW-Adiponektin  $< 0,95\mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zu Patienten in der höchsten HMW-Adiponektinquartile (HMW-Adiponektin  $> 2,95 \mu\text{g/ml}$ ) signifikant um den Faktor 7,041 (95%Konfidenzintervall 2,583-19,190;  $p < 0,001$ ) erhöht. Auch für Patienten in Quartile 2 (HMW-Adiponektin:  $0,95-1,70 \mu\text{g/ml}$ ; RR:4,949; 95% KI: 1,922-12,743;  $p = 0,01$ ) und Quartile 3 (HMW-Adiponektin:  $1,7-2,95 \mu\text{g/ml}$ ; RR: 2,942; 95%KI: 1,204-7,187;  $p = 0,03$ ) zeigt sich im Vergleich zu den Patienten in der höchsten HMW-Adiponektinquartile ein signifikant erhöhtes RR für eine KHK.

**Abbildung 3c** zeigt, dass eine Abnahme der Ratio über den Quartilen mit einer Zunahme des relativen Risikos (RR) assoziiert ist. So ist das RR bei Patienten mit der niedrigsten Ratio (Quartile 1: Ratio  $< 0,31$ ) im Vergleich zu Patienten in der höchsten Ratioquartile (Ratio  $> 0,52$ ) signifikant um den Faktor 27,299; 95% KI: 6,67-111,702;  $p < 0,001$  erhöht.

## Ergebnisse

Auch für Patienten in Quartile 2 (Ratio: 0,31-0,38; RR 6,958; 95% KI: 2,685-18,002;  $p = 0,02$ ) zeigt sich im Vergleich zu den Patienten in der höchsten Ratioquartile ein signifikant erhöhtes Risiko für eine KHK. In Quartile 3 (Ratio: 0,39-0,52; RR: 1,542; 95% KI: 0,685-3,473;  $p = 0,14$ ) ist hingegen zu sehen, dass es Überschneidungen des RR im 95% KI gibt.

### 3.5 Multivariable Regressionsanalyse

Die Ergebnisse der bivariaten, partial-adjustierten und binär logistischen Analysen zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio mit Prävalenz und Ausmaß der KHK. Dennoch könnten theoretisch begleitende Co-Faktoren für diese Assoziationen verantwortlich sein. In erster Linie ist hier an etablierte, klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren zu denken. Um einen sog. „confounder“ zu berücksichtigen und um eine mögliche Co-Linearität mit einem bekannten kardiovaskulären Risikofaktor auszuschließen, wird der relative Einfluss jedes einzelnen unabhängigen Parameters (Adiponektin, HMW-Adiponektin, Ratio und Risikofaktoren) auf die abhängige Variable (Schweregrad der KHK im Extent Score) mittels der multivariablen Analyse nach dem linearen Modell untersucht. Der Extent Score wurde hierfür ausgewählt, da er eine exakte Quantifizierung der koronaren Atherosklerose ermöglicht und in früheren Untersuchungen besser mit kardiovaskulären Risikofaktoren korrelierte als andere KHK-Scores (25).

## Ergebnisse

**Tabelle 4a** zeigt, dass HMW-Adiponektin, Alter, LDL, Rauchen, hs-CRP und die Einnahme von Statinen unabhängig und signifikant mit dem Ausmaß der KHK im Extent Score assoziiert sind. In der schrittweisen Regressionsanalyse zeigt sich zudem, dass HMW-Adiponektin der einflussreichste Parameter innerhalb dieses Modells darstellt. So war HMW-Adiponektin für 14,8% der Varianz des Extent Scores verantwortlich.

**Tabelle 4a:**

Variable	Analyse 1		
	$\beta$	t	p
HMW-Adiponektin*	- 0,419	- 5,250	< <b>0,001</b>
Alter	0,243	3,741	< <b>0,001</b>
BMI	-0,017	-0,241	0.810
LDL	0,207	3,042	<b>0,003</b>
HDL	- 0,073	0,912	0,363
Triglyzeride*	-0,098	-1,308	0,193
Packyears	0,169	2,502	<b>0,013</b>
hs-CRP*	-0,028	-0,402	0,688
IL-6	0,041	0,601	0,549
Statin-Einnahme†	0,266	4,084	< <b>0,001</b>
r	0,630		
r <sup>2</sup>	0,396		

\*: logarithmisch transformierte Variablen; †: kategoriale Variablen

**Tabelle 4b** zeigt, dass die Ratio, Alter, LDL, Rauchen und die Einnahme von Statinen unabhängig und signifikant mit dem Ausmaß der KHK im Extent Score assoziiert sind. In der schrittweisen Regressionsanalyse zeigt sich zudem, dass die Ratio den einflussreichsten Parameter innerhalb dieses Modells darstellt. So war die Ratio für 20,7% der Varianz des Extent Scores verantwortlich.

Tabelle 4b:

Variable	Analyse 2		
	$\beta$	t	p
Ratio*	- 0,437	- 6,653	< <b>0,001</b>
Alter	0,158	2,543	<b>0,012</b>
BMI	0,064	1,005	0,317
LDL	0,111	1,692	0,093
HDL	- 0,037	- 0,530	0,597
Triglyzeride*	- 0,116	- 1,607	0,110
Packyears	0,174	2,703	<b>0,008</b>
hs-CRP	0,043	0,635	0,526
IL-6*	0,033	0,505	0,614
Statin-Einnahme†	0,215	3,405	<b>0,001</b>
r	0,668		
r <sup>2</sup>	0,447		

\*: logarithmisch transformierte Variablen; †: kategoriale Variablen

### 3.6 ROC-Analyse

Die multivariablen Analysen haben einen unabhängigen und signifikanten Zusammenhang zwischen HMW-Adiponektin, der Ratio und dem Schweregrad der KHK ergeben. Die Frage, welcher der gemessenen Parameter (Adiponektin, HMW-Adiponektin oder Ratio) die beste prädiktive Wertigkeit für 1) die Existenz einer manifesten KHK (Severity Score > 0) und 2) die Existenz einer schweren KHK (Extent Score > 75. Perzentile) besitzt wird mittels der ROC-Analyse untersucht.

**Abbildungen 4a-b** vergleichen die prädiktive Wertigkeit von Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio für das Vorliegen einer manifesten (**Abb. 4a**) oder schweren KHK (**Abb. 4b**).

# Ergebnisse

Abbildung 4a:

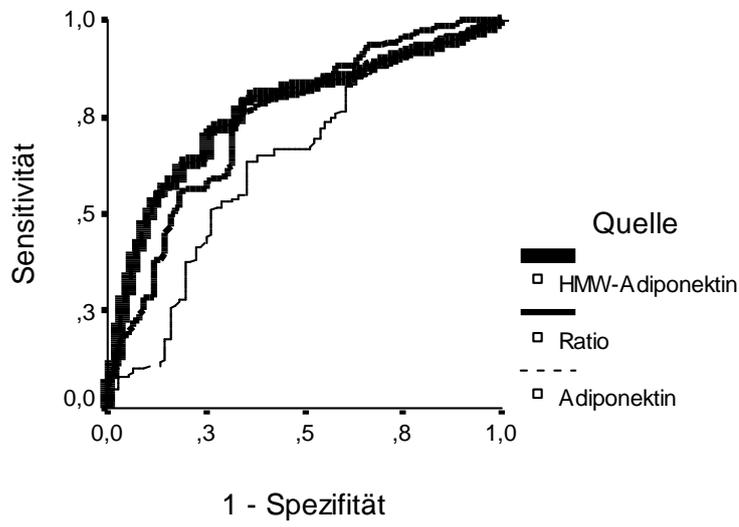
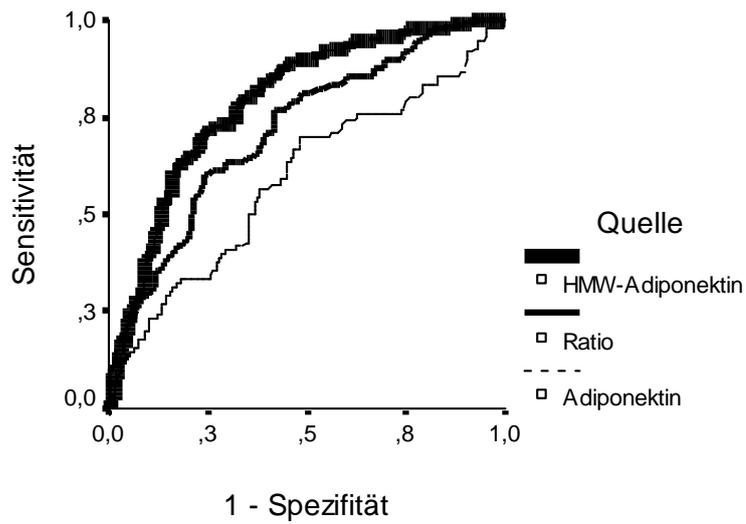


Abbildung 4b:



## Ergebnisse

**Legende:** ROC-Kurven für Adiponektin, HMW-Adiponektin und der Ratio und deren prädiktiver Wert für Prävalenz (**a**) und Schweregrad (**b**) der KHK. Die Diskrimination der Patienten mit und ohne manifeste KHK beruht auf der Einteilung im Severity Score (keine KHK: Severity Score = 0, bzw. KHK: Severity Score  $\geq$  1). Die Diskrimination für Patienten mit milder und schwerer KHK beruht auf der Einteilung im Extent Score (milde KHK: < 25. Perzentile im Extent Score, bzw. schwere KHK: > 75. Perzentile im Extent Score).

In **Abb. 4a** ist zu sehen, dass die area under the curve (AUC) von HMW-Adiponektin signifikant größer ist als die AUC von Adiponektin: HMW-Adiponektin: 0,742; 95% KI: 0,674-0,810 vs. Adiponektin: 0,635; 95% KI: 0,557-0,713;  $p=0,003$ . Der Unterschied zwischen der Ratio und Adiponektin ist ebenfalls statistisch signifikant: Ratio: 0,767; 95% KI: 0,705-0,829 vs. Adiponektin: 0,635; 95% KI: 0,557-0,713;  $p<0,05$ .

Die AUC für HMW Adiponektin in **Abb. 4b** ist signifikant größer als die AUC von Adiponektin: HMW-Adiponektin: 0,673; 95% KI: 0,600-0,746 vs. Adiponektin: 0,568; 95% KI: 0,491-0,646;  $p < 0,001$ . Auch die AUC der Ratio ist signifikant größer als die AUC von Adiponektin: Ratio: 0,718; 95%KI: 0,644-0,792 vs. Adiponektin: 0,568; 95%KI: 0,491-0,646;  $p=0,010$ .

*Interventionsstudie*

## 3.7 Patientenkollektiv

In **Tabelle 5** werden klinische und biochemische Charakteristika der 75 eingeschlossenen Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus zum Zeitpunkt vor Beginn der Behandlung mit Atorvastatin zusammengefasst. Die Daten sind jeweils als Median, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

**Tabelle 5:** Klinische und biochemische Charakteristika des Studienkollektivs

	Median	Mittelwert	<i>Standardabweichung</i>
Alter (Jahren)	57	57,4	<i>+/- 10,1</i>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,1	28,2	<i>+/- 4,3</i>
Cholesterin (mg/dl)	215	212	<i>+/- 33,3</i>
Triglyzeride (mg/dl)*	124	138,1	<i>+/- 75,4</i>
VLDL (mg/dl)*	24	38,4	<i>+/- 56,7</i>
LDL (mg/dl)	144	145,3	<i>+/- 29,8</i>
HDL (mg/dl)	41	42,7	<i>+/- 13,5</i>
Atherogener Index	5,4	5,9	<i>+/- 2,3</i>
hs-CRP (mg/l)*	1,8	3,7	<i>+/- 3,9</i>
HOMA-IR*	11,3	13,8	<i>+/- 10,8</i>
Adiponektin (µg/ml)*	5,5	7	<i>+/- 4,8</i>
HMW-Adiponektin (µg/ml)*	2,8	3,5	<i>+/- 2,3</i>
<i>Ratio*</i>	<i>0,5</i>	<i>0,5</i>	<i>+/- 0,2</i>

\*: Parameter ohne Normalverteilung

### 3.8 Klinische und biochemische Veränderungen nach 8-wöchiger Atorvastatintherapie

**Tabelle 6** zeigt klinische und biochemische Veränderungen nach 8-wöchiger Behandlung mit Atorvastatin 40 mg/d (n =52; linke Spalte) oder Placebo (n=23; rechte Spalte). Es sind jeweils die Ausgangswerte und die Werte nach 8-wöchiger Behandlung dargestellt. Der Unterschied zum Basiswert ist als prozentuale Differenz aufgetragen.

**Tabelle 6:** Klinische und biochemische Charakteristika vor und nach 8-wöchiger Behandlung mit 40 mg/d Atorvastatin oder Placebo

	Atorvastatin (n=52)			Placebo (n=23)		
	Ausgang	8 Wochen	Änderung (%)	Ausgang	8 Wochen	Änderung (%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,3	28,1	-0,7	28,1	28,4	1,1
HbA1c (%)	7,2	7,2	0	7,2	7,3	1,4
Cholesterin (mg/dl)	232,7	159,2	-31,9 <sup>d</sup>	220,4	220,4	0
HDL (mg/dl)	44,9	44,9	0	44,9	44,9	0
LDL (mg/dl)	159,2	89,8	-45,2 <sup>d</sup>	146,9	146,9	0
VLDL (mg/dl)*	44,9	28,6	-27,4 <sup>a</sup>	40,8	40,8	0
Triglyzeride (mg/dl)*	140,4	122,8	-1,5	157,9	149,1	-4,3
hs-CRP (mg/l)*	1,9	1,4	-26,3 <sup>i</sup>	1,8	1,7	-5,6
Adiponektin (µg/ml)*	5,95	6,15	3,4	5,45	5,72	5,0
HMW-Adiponektin (µg/ml)*	1,68	2,39	42,3 <sup>i</sup>	1,76	1,79	1,7
Ratio*	0,40	0,50	25,0 <sup>a</sup>	0,42	0,43	2,4

Darstellung der Daten als Mittelwert oder \*: Median

Signifikante Veränderungen: <sup>a</sup> : p<0,05 und <sup>i</sup> : p<0,001 by Wilcoxon matched-pair-signed-test; <sup>d</sup> : p<0,001 by paired *t*-test

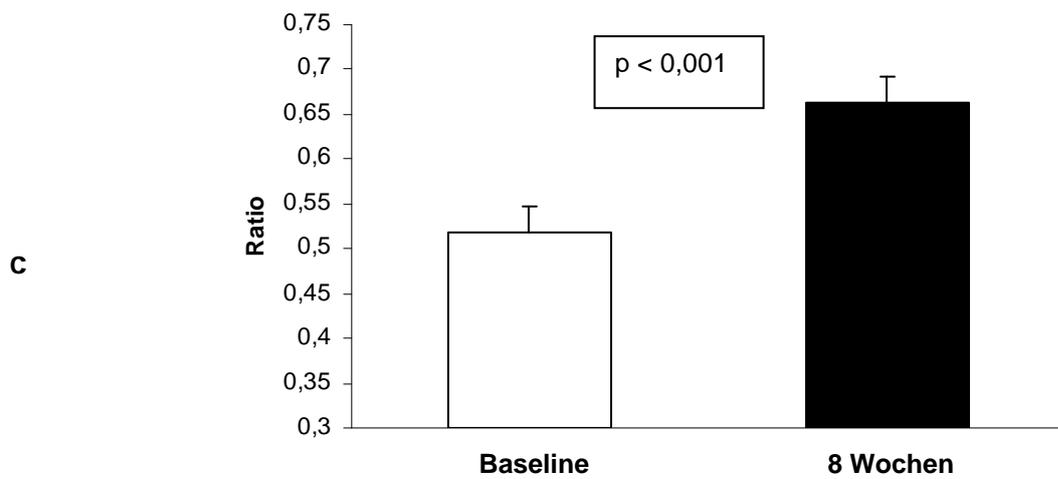
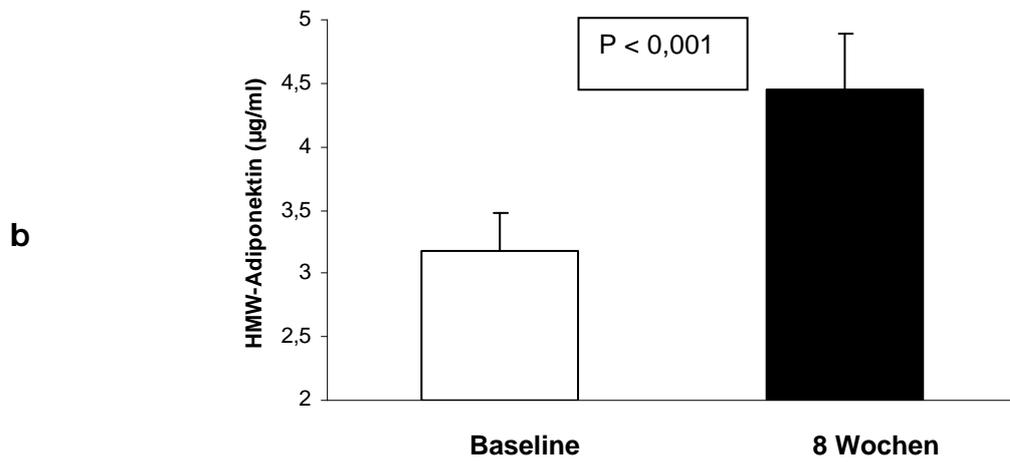
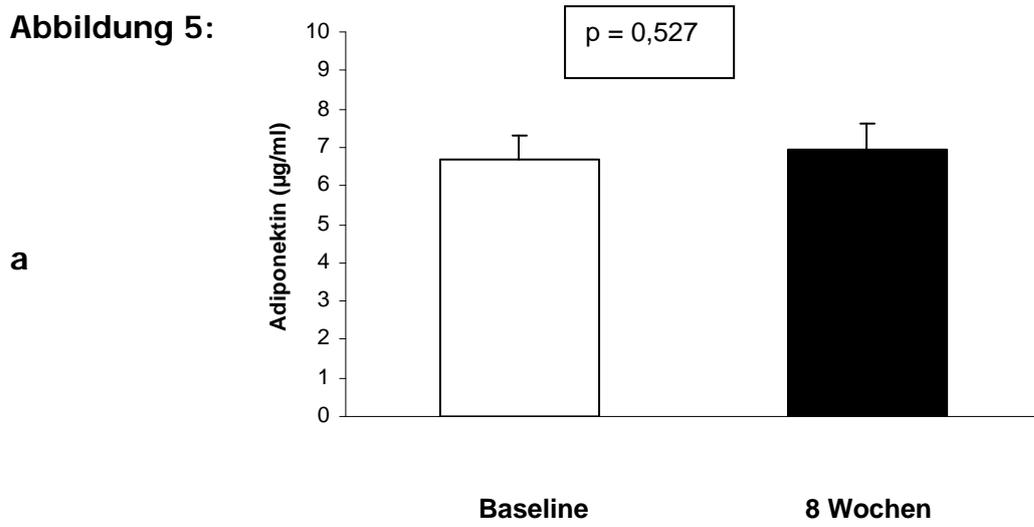
## Ergebnisse

**Tabelle 6** zeigt einen signifikanten Abfall von Gesamtcholesterin, LDL, VLDL und hs-CRP nach 8-wöchiger Behandlung mit 40 mg Atorvastatin/d, der in der Gruppe der Patienten, die mit einem Placebo behandelt wurden, nicht zu verzeichnen ist.

### 3.9 Einfluss der Atorvastatinbehandlung auf Adiponektin, HMW-Adiponektin und die Ratio

**Abbildung 5** zeigt in einem Balkendiagramm die Serumspiegel von Adiponektin (**Abb. 5a**), HMW-Adiponektin (**Abb. 5b**) und der Ratio (**Abb. 5c**) vor und nach 8-wöchiger Behandlung mit Atorvastatin. Die Balken repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

Abbildung 5:



## Ergebnisse

Nach 8-wöchiger Behandlung mit Atorvastatin kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen der Adiponektinkonzentration (+3,4%; 5,95 vs. 6,15 µg/ml;  $p=0,527$ ; **Tabelle 6 u. Abb. 5a**). Es kommt jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Serum-HMW-Adiponektinkonzentration um 42,3% (1,68 vs. 2,39 µg/ml;  $p<0,001$ ; **Tabelle 6 u. Abb. 5b**). Ebenso ist ein signifikanter Anstieg der Ratio um 25,0% (0,40 vs. 0,50;  $p<0,001$ ; **Tabelle 6 u. Abb. 5c**) zu verzeichnen.

**Tabelle 6** veranschaulicht, dass in der Gruppe der mit einem Placebo behandelten Patienten keine signifikanten Veränderungen der Adiponektinkonzentration (+5%; 5,45 vs. 5,72 µg/ml), der HMW-Adiponektinkonzentration (+1,7%; 1,76 vs. 1,79 µg/ml) und der Ratio (2,4%; 0,42 vs. 0,43) auftreten.

## 4. Diskussion

### 4.1 Adiponektin, HMW-Adiponektin und Koronare Herzkrankheit: Assoziationen und mögliche Effekte

Die Ergebnisse der vorgestellten Studie zeigen einen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen Adiponektin- und HMW-Adiponektinspiegeln und einer angiographisch erfassten, manifesten KHK. Darüber hinaus konnte erstmals auch eine negative Korrelation zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und dem individuellen Schweregrad der KHK gefunden werden. Die Korrelation bleibt auch nach Anpassung für klassische Risikofaktoren wie Alter, Diabetes mellitus, Rauchen, LDL, Hypertonus und BMI hoch signifikant. Die Studienergebnisse lassen einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Adiponektin, HMW-Adiponektin und koronarer Atherosklerose vermuten, eine Hypothese, die sich auch auf zahlreiche in vitro und tierexperimentelle Studien stützen kann. Adiponektin besitzt zahlreiche anti-atherogene, anti-inflammatorische und insulinsensitivierende Eigenschaften. Im Folgenden sollen als Schwerpunkt besonders die anti-atherosklerotischen Eigenschaften hervorgehoben und diskutiert werden.

Schon Kumada et al zeigten, dass Patienten mit manifester KHK niedrigere Adiponektinspiegel aufwiesen als eine gematchte Kontrollgruppe freiwilliger Blutspender (51; 60). Ein herausragender Initialschritt bei der Entstehung von Atherosklerose ist die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen, verursacht durch eine exzessive Aufnahme pro-atherogener Lipoproteine durch diese Immunzellen (52). Niedrige Adiponektinspiegel fördern die Bildung von Schaumzellen über eine begleitende Erhöhung der Plasmaspiegel triglyzeridreicher Lipoproteine (und deren lipolytisch wirksamen Reste), die für die Bildung von Schaumzellen verantwortlich sind. Darüber hinaus begünstigen niedrige Adiponektinspiegel den Abbau zirkulierender HDL-Partikel und verringern so den protektiven Lipidefflux aus der Gefäßwand (31; 34; 52). In

## Diskussion

in vitro Untersuchungen zeigten, dass die Inkubation von Makrophagen mit physiologischen Adiponektinkonzentrationen die Bindung umgewandelten LDLs an Zelloberflächenproteine hemmt (52). Diese Studien belegen einen direkten hemmenden Effekt von Adiponektin bei der Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen. Adiponektin reduziert auch die Retention von atherogenen Lipoproteinen in atherosklerotischen Läsionen über direkte Wirkung auf dafür spezifische Enzyme (108; 47; 52) und es unterdrückt Gene, die für die Bildung von Schaumzellen mitverantwortlich sind (47; 52). Adiponektin supprimiert außerdem die Anreicherung von Lipiden in Makrophagen. Dies wiederum führt zu einer erniedrigten Aufnahme von oxidiertem LDL und damit ebenfalls zur Hemmung der Schaumzellbildung (60).

Ein weiterer anti-atherogener Effekt von Adiponektin ist die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen der Gefäßwand (71). Adiponektin bindet an PDGF-BB und das subendotheliale Kollagen und verhindert damit auch die Migration glatter Muskelzellen. Endothelzellen exprimieren Adiponektinrezeptoren, über die eine Erhöhung der Stickstoffmonoxidproduktion (NO) vermittelt wird. So ist in Adiponektin-Knockout-Mäusen (Adiponektin  $-/-$ ) die endothelvermittelte Vasodilatation vermindert (60; 70). Adiponektin  $-/-$  Mäuse zeigen zudem eine größere Dicke der Intima und vor allem auch eine verstärkte Proliferation der glatten Muskelzellen nach Verletzung eines Gefäßes (24; 50; 60; 86). Desweiteren stimuliert Adiponektin in vitro über eine Aktivierung der AMPK-Signalkaskade die Migration von Endothelzellen und deren Differenzierung in kapillarartige Strukturen (71). Über diese AMPK-Kaskade wird auch die von Adiponektin stimulierte NO-Produktion in Endothelzellen vermittelt. Hier wirkt Adiponektin über Phosphorylierung des Enzyms „endothelial-nitric-oxide-synthase“ (eNOS) (11; 71). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Herunterregulierung von Adiponektin und assoziierter AMPK-regulierter Stoffwechselwege zu der häufig bei Adipositas beobachteten sog. endothelialen Dysfunktion führt (3; 52). Eine Reihe weiterer potentiell anti-atherogener Effekte wird Adiponektin zugeschrieben.

So hemmt Adiponektin die Aktivierung von NF $\kappa$ -B und TNF- $\alpha$ , Faktoren, die für die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, u. a. VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin, verantwortlich sind (26; 69). Eine mögliche Adhäsion von Monozyten am aktivierten Endothel wird hierdurch verhindert. Nach einer Verletzung des Endothels ist Adiponektin an der Stimulation der Angiogenese, aber vor allem auch an der Hemmung der Endothelzell-Apoptose beteiligt (48; 96).

Zusammenfassend verfügt Adiponektin sowohl über rezeptorvermittelte, direkte Effekte am Gefäßendothel, als auch über indirekte Effekte, z.B. über die Aktivierung von protektiven Stoffwechsellaskaden, die einen pathophysiologisch begründeten Schutz vor Atherosklerose und assoziierten kardiovaskulären Komplikationen bieten.

### **Die Rolle von HMW-Adiponektin – Hypothese und pathophysiologische Ansätze:**

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass HMW-Adiponektin signifikant mit dem Ausmaß der KHK korreliert. Das relative Risiko für KHK kann in adjustierten Analysen signifikant besser mit der HMW-Form von Adiponektin vorausgesagt werden als mit der Gesamtadiponektinkonzentration. Es ist daher zu diskutieren, ob HMW-Adiponektin nicht die aktive Form dieses Adipokins darstellt. Darüber hinaus könnten andere Isoformen von Adiponektin, wie z.B. die LMW-Form, einen neutralen oder gar ungünstigen Einfluss auf die Adiponektin-vermittelte Gefäßprotektion ausüben. Neueste Erkenntnisse deuten in der Tat darauf hin, dass der Anteil von HMW-Adiponektin für die biologisch aktiven Effekte von Adiponektin in Stoffwechsel und Atherosklerose verantwortlich ist.

Posttranslationale Modifikationen, die nach der Expression von Adiponektin-Monomeren im Zytoplasma von Adipozyten stattfinden, sind essentiell für die Bildung der höhergeordneten Strukturen des Adiponektins, wie etwa der HMW-Form. Bei Typ 2-Diabetikern zeigen sich deutlich weniger posttranslationale

## Diskussion

Modifikationen, resultierend in einem erniedrigten HMW-Adiponektin-Anteil. Auch der Quotient aus HMW-Adiponektin und Adiponektin (was den Anteil des biologisch aktiven Adiponektins widerspiegelt) war im Vergleich zu Gesunden signifikant verringert (92). Als mögliche Ursache werden zelluläre Interaktionen mit advanced-glycated-endproducts (AGEs) diskutiert. AGEs werden als wichtige pathophysiologische Faktoren bei der Entstehung diabetes-assoziiertes Stoffwechselforgänge angesehen. Zelluläre Interaktionen zwischen niedermolekularen Adiponektinformen und AGEs könnten zu einer verringerten de-novo Synthese von HMW-Adiponektin in Adipozyten führen, was sich dann in Folge verminderter Sekretionsleistung in erniedrigten HMW-Konzentrationen widerspiegelt. In vitro Untersuchungen unterstützen diese Hypothese. In *E. coli* Bakterien, welche keine posttranslationalen Modifikationen durchführen können, ist eine Bildung von HMW-Adiponektin nicht möglich. Diese Bakterien sind lediglich zur Bildung von Trimeren (LMW) und Hexameren (MMW) fähig. Auch Mutanten, deren Lysinreste, an denen hauptsächlich die posttranslationalen Modifikationen bei der Generierung von HMW-Adiponektin stattfinden, durch andere Aminosäuren ersetzt wurden, konnten keine HMW-Form bilden (92).

Posttranslationale Modifikationen scheinen also eine überaus wichtige Rolle bei der Bildung der HMW-Form des Adiponektins zu spielen und könnten bei Patienten mit Diabetes mellitus und/oder KHK vermindert sein. Dies würde nicht nur zu einer selektiven Reduktion des zirkulierenden HMW-Adiponektins führen, sondern hätte auch einen Ausfall anti-diabetogener und anti-atherogener Effekte des HMW-Adiponektins zur Folge. Die Reduktion von HMW-Adiponektin kann durch eine kompensatorische Erhöhung niedermolekularer Adiponektinformen hingegen nicht kompensiert werden, da die verschiedenen Adiponektin-Multimere unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen. So wurde gezeigt, dass HMW-Adiponektin die aktive Form bei der Unterdrückung der hepatischen Glukoneogenese ist (92). Auch im Gefäß ist selektiv das HMW-Adiponektin in der Lage die Endothelzellen vor Apoptose zu schützen, während weder die LMW- noch die MMW-Formen diesen Effekt erzielen (92). Insulinresistente Patienten weisen im Vergleich zu insulinsensiblen Individuen

## Diskussion

niedrigere Spiegel von Adiponektin aber auch von HMW-Adiponektin auf. Gleichzeitig zeigen sich jedoch keine Unterschiede in der Konzentration von LMW (53). Das lässt vermuten, dass der Unterschied in der Adiponektinkonzentration von insulinresistenten und insulinsensiblen Individuen durch die unterschiedliche Konzentration des HMW-Adiponektins bestimmt wird. Die Behandlung mit Thiazolidindionen führte in klinischen Studien zur Erhöhung der Adiponektinlevel. Nach Auftrennung in die einzelnen Isoformen war dieser Anstieg größtenteils durch den selektiven Anstieg des HMW-Anteils zu erklären. Ebenso führt eine Gewichtsabnahme zum Anstieg von HMW-Adiponektin, ohne signifikante Änderung der LMW- und MMW-Fraktionen. In weiteren klinischen Studien zeigten sich für HMW-Adiponektin und auch für die Ratio niedrigere Werte bei diabetischen Männern mit KHK als bei jenen ohne KHK (92). Ferner war HMW-Adiponektin und die Ratio unabhängig mit den LDL- und HDL-Cholesterinkonzentrationen assoziiert. Individuen mit höheren HMW-Adiponektinkonzentrationen hatten so signifikant höhere Konzentrationen des kardioprotektiven HDL-Cholesterins (52). Auch wenn die Bedeutung der verschiedenen Adiponektin-Multimere für die Vermittlung der biologischen Aktivität dieses Hormons noch nicht vollständig aufgeklärt ist, unterstützen zahlreiche Studien die Vermutung, dass die HMW-Form die aktive Komponente des Adiponektins ist. Dies wird durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weiter untermauert.

Die präsentierten Daten zeigen, dass HMW-Adiponektin stärker mit dem Ausmaß der KHK korreliert als Adiponektin. Multivariable Analysen zeigen zudem, dass das HMW-Adiponektin der stärkste unabhängige Prädiktor für das Ausmaß einer KHK (gemessen am Extent-Score) ist. In diesen Analysen war der Anteil des HMW-Adiponektins gewichtiger als der Einfluss von BMI, Alter, Rauchen und einigen Lipoproteine, wie LDL und HDL. Viele Erkenntnisse zeigen also, dass HMW-Adiponektin nicht nur über Beeinflussung von typischen Risikofaktoren wie z.B. HDL-Cholesterin und Triglyzeriden protektive Funktionen vermittelt, sondern auch direkten Einfluss auf das atherosklerotische Geschehen am Gefäßbett ausübt. Man kann daher spekulieren, dass einer selektiven

Erhöhung des HMW-Adiponektins eine größere Bedeutung in der Prävention kardiovaskulärer Komplikationen zukommen könnte, als einer Erhöhung der Gesamtkonzentration von Adiponektin. Aufgrund der ausgeprägten protektiven Effekte von Adiponektin bei der Entstehung von Atherosklerose, die vermutlich wie oben beschrieben durch die HMW-Isoform zu begründen sind, wäre es wünschenswert HMW-Adiponektin entweder pharmakologisch oder durch Lebensstiländerung im Plasma von Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren zu erhöhen. Eine klinische Studie zeigte, dass eine Gewichtsabnahme zu einem Ansteigen von HMW-Adiponektin führt (8). Mit dieser Gewichtsreduktion scheint also bereits eine Erhöhung der aktiven Form von Adiponektin erreicht zu werden, was sich folglich in einem anti-atherogenen Lipidprofil und verbesserter Gefäßfunktion widerspiegeln könnte. Weitere Studien bewiesen, dass eine Behandlung mit so genannten Thiazolidindionen (Glitazonen), die auch als Insulinsensitizer bezeichnet werden, zu einem signifikanten Anstieg der HMW-Adiponektinkonzentration führte (43; 96). Der insulinsensitivierende Effekt könnte auch hier über die Erhöhung des HMW-Adiponektins, zumindest partiell miterklärt werden. Alternative pharmakologische Interventionen bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko mit dem Ziel der Steigerung des HMW-Adiponektins wären für die Zukunft wünschenswert. Der Effekt einer Behandlung mit Atorvastatin auf das zirkulierende HMW-Adiponektin bei Patienten mit Typ 2 Diabetes wird unter Kapitel 4.4 diskutiert.

### 4.2 HMW-Adiponektin und Kalkulation der HMW-Adiponektin/Adiponektin Ratio: Diagnostische und therapeutische Perspektiven

Wie die Ergebnisse veranschaulichen kann unter allen ermittelten kardiovaskulären Risikomarkern mit Hilfe von HMW-Adiponektin die höchste Aussagekraft bezüglich des relativen Risikos einer manifesten KHK getroffen

## Diskussion

werden. Darüber hinaus ist HMW-Adiponektin und auch die Ratio ein unabhängiger Prädiktor für das Ausmaß der koronaren Atherosklerose. Als sensitiver Marker für KHK scheint unter Berücksichtigung der AUC der ROC-Analyse HMW-Adiponektin und auch die Ratio geeigneter als das Gesamtadiponektin zu sein. Folglich ist zu diskutieren, welche prognostische Wertigkeit serologische Bestimmungen von HMW-Adiponektin und/oder Adiponektin bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil in der klinischen Primär- und Sekundärprävention erzielen könnten. Adiponektin stellt in diesem kleineren Kollektiv einen geeigneten diagnostischen Marker für das Vorliegen einer manifesten KHK dar. Sollten jedoch genauere Aussagen über das gesamte Ausmaß einer Koronaren Herzkrankheit getroffen werden, z.B. bei der Evaluation möglicher interventioneller und/oder operativer Therapieverfahren der KHK, so wäre die selektive Bestimmung von HMW-Adiponektin wohlmöglich effizienter. Sowohl Adiponektin als auch HMW-Adiponektin können mittels ELISA quantifiziert werden, was eine schnelle und unkomplizierte Analyse in der klinischen Routine bedeutet. Obwohl mit der zusätzlichen Kalkulation der Ratio aus Adiponektin und HMW-Adiponektin eine geringfügig verbesserte Aussage über das relative Risiko für KHK getroffen werden kann, scheint die alleinige Bestimmung von HMW praktikabler zu sein, da dies in einer einzigen Serumanalyse zu erzielen ist.

Zukünftige Forschungsvorhaben werden klären müssen, ob eine supplementäre Adiponektingabe (z.B. in Form eines rekombinanten humanen Proteins) das Potential zur therapeutischen Behandlung und/oder Prävention von Atherosklerose, Metabolischem Syndrom und Typ 2 Diabetes besitzt. Spekulativ könnte hier das HMW-Adiponektin das größte Potential besitzen, basierend auf den zahlreichen Untersuchungen, die dies als die biologisch aktive Form des Adiponektins postulieren. Darüber hinaus ist die Rolle der niedermolekularen Adiponektinisoformen noch gänzlich unbekannt. So wird zu erforschen sein, ob die niedermolekularen Adiponektin-Multimere, wie etwa die LMW-Form, tatsächlich ungünstige Effekte auf Inflammation und Metabolismus ausüben und so womöglich dem protektiven HMW-Effekt sogar entgegenwirken könnten.

### 4.3 Adiponektin: Ein neues Target pleiotroper Statineffekte ?

Statine sind pharmakologisch wirksame Substanzen, die ihren Effekt über die Hemmung der 3-Hydroxy-1-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMGCoA)-Reduktase vermitteln. Dieses Protein stellt das Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinbiosynthese dar und katalysiert die Bildung von Mevalonat aus HMGCoA. In nachfolgenden Stoffwechselkaskaden wird in weiteren biochemischen Veränderungen Cholesterin generiert. Statine werden daher synonym als HMGCoA-Reduktase-Hemmer oder auch Cholesterinsyntheseenzym (CSE)- Hemmer bezeichnet. Sie sind Mittel der ersten Wahl zur medikamentösen Cholesterinsenkung bei Patienten mit Hypercholesterinämie in der Primärprävention und bei Patienten mit makrovaskulären Komplikationen im Rahmen einer KHK und/oder Typ2 Diabetes in der Sekundärprävention. In großen populationsbasierten kontrollierten Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass Statine zu einer signifikanten Senkung von Gesamt- und kardiovaskulärer Mortalität führen (CARE-; 4S-; LIPID-; WOSCOP-; AFCAP-; CARDS- Studie).

Der Haupteffekt der Statine lässt sich durch den anti-atherosklerotischen Effekt der Senkung pro-atherogener Lipoproteine erklären. Darüber hinaus sind jedoch auch eine Reihe günstige Effekte von Statinen auf Inflammation, Endothel- und Gefäßfunktion bekannt, die unabhängig von der cholesterinsenkenden Wirkung auftreten. Zu diesen so genannten pleiotropen Statineffekten zählen auch Veränderungen von Stoffwechselfvorgängen, bei denen Adiponektin eine wichtige Rolle zu spielen scheint (etwa die Erhöhung der LPL-Aktivität unter Atorvastatin). Es lässt sich daher mutmaßen, dass metabol-pleiotrope Statineffekte, über eine direkte oder indirekte Wirkung auf Adiponektin vermittelt werden könnten.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine 8-wöchige Behandlung mit Atorvastatin nicht zu einer Erhöhung der Gesamtadiponektinkonzentration führt. Eine genauere Analyse enthüllt jedoch, dass eine über 40%ige Steigerung des

Anteils von HMW-Adiponektin bei gleichzeitiger Reduktion der MMW und LMW-Formen aufgetreten ist. Dies lässt vermuten, dass es unter Statintherapie zu einem Shift in der Verteilung multimerer Isoformen des Adiponektins gekommen ist.

### 4.4 Statine und HMW-Adiponektin: Gemeinsame Assoziationen als Hinweis auf eine kausale Verknüpfung?

Statine verbessern das Lipidprofil. Lipidabhängige Veränderungen, die durch Statine bewirkt werden, sind die Erniedrigung des Gesamtcholesterins, die Reduzierung von LDL-Cholesterin im Plasma und die Erniedrigung der Triglyzeride. Desweiteren führen CSE-Hemmer zu einem signifikanten Anstieg des kardioprotektiven HDL-Cholesterins. Durch Hochregulation der hepatischen und peripheren LDL-Rezeptoren kommt es zu einer gesteigerten Cholesterin-Clearance aus der Zirkulation. Zirkulierendes LDL-Cholesterin wird hierbei vermehrt in die Zelle aufgenommen. Auch für Adiponektin werden anti-atherogene Effekte im Lipidmetabolismus vermutet. Adiponektin könnte über die Hemmung der Expression der Hepatischen Lipase (HL) zu einer Erhöhung der HDL-Konzentration führen (22). Dieser Mechanismus könnte einen Anteil der unter Statinen beobachteten Erhöhung des HDL-Cholesterins erklären, da die beobachtete Assoziation zwischen CSE-Hemmern und HMW-Adiponektin über die Beeinflussung HL-abhängiger Stoffwechselwege vermittelt werden könnte.

Statine wirken anti-inflammatorisch. So bewirkt eine Behandlung mit diesen Substanzen ein Absinken des CRP-Wertes im Plasma. In klinischen Studien wurde dieser Effekt auf die gleichzeitige Senkung von Interleukin-6 oder TNF- $\alpha$  (beides potente Induktoren der hepatischen CRP-Expression) zurückgeführt. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch in Studien an Patienten mit Typ 2 Diabetes nicht reproduzieren, so dass alternativ anti-inflammatorische Statineffekte

## Diskussion

vermutet werden. Erhöhte Adiponektinlevel wiederum sind mit erniedrigtem CRP assoziiert. Über die Beeinflussung von Adiponektin und seiner multimeren Verteilung könnte ein kausaler Zusammenhang zwischen Statintherapie und CRP-Senkung postuliert werden.

Experimente an Monozyten zeigten, dass durch Statine eine 38%ige Reduktion der Konzentration von TNF- $\alpha$  bewirkt wird (32). Auch ist bekannt, dass eine erhöhte adipozytäre Adiponektinexpression zu einer reduzierten Konzentration von TNF- $\alpha$  im Fettgewebe führt (56; 96). Dadurch lässt sich vermuten, dass Statine über die selektive Steigerung von HMW-Adiponektin zu einer signifikanten Reduktion von TNF- $\alpha$  beitragen und damit einen bisher unbekanntem anti-inflammatorischen Statineffekt erzielen. Eine weitere anti-inflammatorische Wirkung der Statine ist die Hemmung der Expression des pro-inflammatorischen interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM1) auf Endothelzellen. Diese Rezeptoren vermitteln die Anheftung von inflammatorischen Zellen und ermöglichen deren Infiltration in die Gefäßwand. Adiponektin führt zu einer Hemmung der Expression von ICAM1 und VCAM1 (26; 69), eine weitere gemeinsame Assoziation zwischen Statinen und Adiponektin. Statine besitzen darüber hinaus eine hemmende Wirkung auf die Schaumzellbildung, da sie den Makrophagen-Scavenger-Receptor (SR-A1/2) herunterregulieren und so die zelluläre Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin reduzieren (31; 34; 52; 60). Auch Adiponektin hemmt die Anreicherung von Lipiden in Makrophagen und zeigt hemmende Wirkung auf den makrophagozytären SR-A2. Dies führt zu einer verminderten Aufnahme von LDL-Cholesterin in Makrophagen und zu einer reduzierten Bildung von Schaumzellen (31; 34; 52; 60). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Statine über die Erhöhung von HMW-Adiponektin einen wichtigen Anteil seiner anti-inflammatorischen Effekte vermitteln könnten. Dies hätte über eine Reduktion der Schaumzellbildung auch signifikante Effekte auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose.

Statine haben endothelprotektive Effekte. So zählen zu den weiteren pleiotropen, lipidunabhängigen Mechanismen der Statine die Verbesserung der

## Diskussion

Endothelfunktion und der frühen Veränderungen der endothelialen Dysfunktion. Zudem wird in der Gefäßwand eine statin-abhängige Hemmung der Aktivierung und des Wachstums glatter Muskelzellen erzielt. Diese kombinierten Effekte tragen nicht zuletzt zur Plaquestabilisierung und Hemmung der Thrombusbildung bei, die als pathophysiologisches Korrelat einer bereits vorangeschrittenen Atherosklerose angesehen werden. Endothelzellen sind wesentlich für die Gefäßdilatation und somit auch für die Koronarperfusion verantwortlich. Die endothel-abhängige Vasodilatation wird durch endothelial freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt. Patienten mit Hypercholesterinämie zeigen eine reduzierte Bereitstellung von endothelalem NO, die durch eine verminderte endotheliale NO-Synthetase (eNOS)-Aktivität zu begründen ist. Werden diese Patienten mit Statinen behandelt, führt dies zu einer Verbesserung ihrer Endothelfunktion. Diesen Effekt hat man anfangs durch die Senkung von LDL-Cholesterin begründet. Neue Studien zeigen jedoch, dass die CSE-Hemmer zu einer Hochregulation der Expression der eNOS führen (11, 71; 35). Auch Adiponektin führt über eine Aktivierung der AMPK-Aktivität zur Produktion von NO in endothelialen Zellen. Adiponektin bewirkt über die Phosphorylierung der NO-Synthetase eine Aktivierung dieses Enzyms (11; 52). Die verbesserte Endothelfunktion nach Gabe von Statinen könnte somit durch die begleitende Erhöhung des HMW-Adiponektins und der resultierenden Aktivierung der NO-Synthetase begründet werden.

Statine hemmen die Proliferation und Migration humaner glatter Muskelzellen der Gefäße. Auch hier zeigt Adiponektin ähnliche Effekte, indem es über Bindung an PDGF-BB die Migration glatter Muskelzellen im Gefäß supprimiert und die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt (71).

#### 4.5 PPAR-Aktivierung: Der fehlende Link zwischen Statin und Adiponektin?

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Statine zu einer verminderten Infiltration mononukleärer Zellen in die Neointima führen. Eine Hemmung der Expression von Monocyte-Chemoattractant-Protein (MCP)-1 und einer geringeren Aktivität des nukleären redox-sensitiven Transkriptionsfaktors nuclear-factor kappa (NFκ)-B werden hierfür verantwortlich gemacht (26; 35; 69). MCP-1 ist ein Protein, das neben seiner chemotaktischen Rolle auch die Transformation von Gewebsmakrophagen aus infiltrierenden Monozyten fördert, ein wesentlicher Initialschritt in der Pathogenese der Atherosklerose. Besonders interessant für den Zusammenhang zwischen Statin und Adiponektin scheint aber NFκ-B zu sein. NFκ-B hat neben zahlreichen anderen Effekten auch Einfluss auf die PPAR-Kaskade, die eine herausragende Rolle im Lipidmetabolismus spielt. Statine werden deshalb auch als NFκ-B-Inhibitoren bezeichnet. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Genen regulieren, die bei der Fettsäureaufnahme- und oxidation im Lipidmetabolismus, der Glukosehomeostase und Inflammation involviert sind (44; 71). Es existieren drei verschiedene Subtypen: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$  wird in Geweben exprimiert, die einen hohen Fettsäurekatabolismus aufweisen, z.B. Leber, Fettgewebe oder Skelettmuskel. PPAR $\beta/\delta$  wird ubiquitär exprimiert und PPAR $\gamma$  ausschließlich im weißen und braunen Fettgewebe (9; 74).

Zur Aktivierung PPAR-abhängiger Gene bilden PPARs Heterodimere mit den nukleären 9-cis retinoic acid receptors (RXRs). Dieser Komplex bindet DNA-spezifische Sequenzen, die so genannten peroxisome proliferator-response elements (PPREs) (74). Außerdem sind PPARs auf spezifische transkriptionale Coaktivatoren angewiesen, wie zum Beispiel peroxisome proliferator-activator receptor- $\gamma$  coactivator 1 (PGC-1) und seine Subformen (74; 76; 77).

## Diskussion

Eine NFκ-B- Aktivierung führt zu einer herabgesetzten PGC-1-Expression was wiederum in einer reduzierten physiologischen Interaktion zwischen PPARβ/δ und seinem Coaktivator (PGC-1) resultiert. PPAR kann daraufhin seine regulatorischen Elemente nur eingeschränkt binden, was ein Absinken von PDK4 (pyruvatdehydrogenase kinase 4) bewirkt. PDK4 ist ein regulatorisches Enzym im Fettsäuremetabolismus. Die Aktivierung von NFκ-B führt so unmittelbar zu einer Beeinträchtigung des Fettsäuremetabolismus. Diese ungünstigen Veränderungen wurden in Experimenten durch die Gabe von Statinen verhindert (74). Statine bewirken eine Hemmung von NFκ-B und damit eine bessere Interaktion von PPARs und ihren Coaktivatoren, was wiederum zu einer Aktivierung der PDK4 führt und in einer verbesserten Fettsäureaufnahme- und oxidation resultiert.

Wie lässt sich der Kreis zwischen Statin, PPAR und Adiponektin schließen und der vermutete Effekt von Atorvastatin auf Adiponektin erklären?

Die Expression des Adiponektin-Gens unterliegt einem PPAR-regulierendem Einfluss. So wird die Expression von Adiponektin entscheidend durch PPARγ-abhängige Stoffwechselwege reguliert. Interventionelle Studien konnten zeigen, dass PPARγ-Agonisten wie die Thiazolidindione die Plasmakonzentration von Adiponektin erhöhen (60). PPARγ-Agonisten erhöhen die Adiponektin-mRNA-Expression im Fettgewebe adipöser Mäuse (60). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass AdipoR2, einer von zwei bekannten spezifischen Adiponektinrezeptoren, sowohl von PPARγ als auch von PPARα reguliert wird (60). Eine PPAR-Aktivierung führt also folglich nicht nur zur Steigerung der Expression von Adiponektin, sondern auch zur Verbesserung der peripheren Adiponektinwirkung über Induktion von Adiponektinrezeptoren (AdipoR2). Umgekehrt wurde beobachtet, dass bei adipösen diabetischen Mäusen (ob/ob) eine Behandlung mit Adiponektin zu einer erhöhten Expression PPARα-regulierter Gene führte. Es wurde folglich die Hypothese postuliert, dass Adiponektin nicht nur passiv PPAR-reguliert wird, sondern auch einen aktiven PPARα-aktivierenden Effekt vermittelt (40). Eine Aktivierung PPAR-regulierter Gene und Stoffwechselwege durch Adiponektin könnte im Zusammenhang mit

## Diskussion

zahlreichen metabolen Adiponektineffekten stehen: Aktivierung der  $\beta$ -Oxidation, Erniedrigung des Triglyzeridgehaltes in Leber und Skelettmuskel und Verbesserung der Insulinsensitivität (40).

Statine, die über die NF $\kappa$ -B-Hemmung eine Steigerung der Expression von PPAR und der Wirkung von PPAR-regulierten Stoffwechselwegen erzielen, könnten so auch zu einer Erhöhung von HMW-Adiponektin beitragen. Allerdings erscheint eine Beeinflussung auf der Ebene der Gen-Expression von Adiponektin zumindest fraglich, da sich unter Statinen kein Effekt auf die Gesamtkonzentration von Adiponektin nachweisen ließ. Da die Statinbehandlung allerdings zu einem signifikanten Anstieg des HMW-Adiponektins geführt hat, wäre denkbar, dass Statine über die Aktivierung von PPARs zu einer Beeinflussung posttranslationaler Modifikationen des Adiponektins führen. Eine Verbesserung dieser komplex-bildenden Prozesse, die im Zytoplasma von Adipozyten stattfinden, könnte zu der beobachteten HMW-Erhöhung führen. Gleichzeitig wäre die Konzentration der niedermolekularen Adiponektinformen auf Grund der verbesserten HMW-Komplexbildung verringert. Dieser vermutete Effekt lässt sich in den behandelten Typ 2 Diabetikern nachvollziehen. Einen wertvollen Hinweis auf die Rolle von PPAR bei den posttranslationalen Modifikationen des Adiponektins geben die Thiazolidindione (73; 96). So erhöhen Glitazone zwar auch den Gesamtadiponektinspiegel, allerdings ist dies hauptsächlich durch eine Steigerung des HMW-Anteils zu begründen. Neben der Gen-Aktivierung vermitteln Thiazolidindione über PPAR $\gamma$  also auch Effekte, die zu einer verbesserten Adiponektinkomplexbildung in Fettzellen beitragen. Es wäre also gut möglich, dass Statine über PPAR $\gamma$  einen direkten Einfluss auf die posttranslationalen Modifikationen haben, die für die Bildung der HMW-Isoformen essentiell sind und über diesen Weg die vermehrte Produktion von HMW-Adiponektin ermöglichen.

Zusammenfassend ist unbestritten, dass Statine eine Vielzahl lipidabhängiger und lipidunabhängiger Effekte besitzen, die eine Therapie bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko sowohl in der Primär- als auch

## Diskussion

Sekundärprävention unverzichtbar macht. Adiponektin ist ein anerkannter Risikofaktor für primäre Atherosklerose und viele der protektiven Effekte von Adiponektin zeigen enge Überschneidungen mit den so genannten pleiotropen Statineffekten. Die Hauptwirkung der Statine beruht auf der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. Ein direkter Effekt dieser Enzymhemmung, unabhängig von der cholesterin-senkenden Wirkung, auf Inflammation und Endothelprotektion ist jedoch nicht nachweisbar. Es bedarf also eines biologisch aktiven „Transmitters“, der diese pleiotropen Statineffekte in vivo vermittelt. Die Ergebnisse der Interventionsstudie lassen vermuten, dass HMW-Adiponektin ein solcher Effektor sein könnte. Die Beobachtungen, dass eine Statinbehandlung bereits nach 8 Wochen zu einer signifikanten Erhöhung der HMW-Adiponektinkonzentration geführt hat, lassen vermuten, dass dieser Effekt für einen signifikanten Anteil der positiven Effekte von Atorvastatin auf Lipidmetabolismus, Endothelprotektion und Inflammation verantwortlich sein könnte. Prospektive Studien an großen klinischen Kohorten von Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil, wie etwa Typ 2 Diabetes, viszerale Adipositas und/oder dem Metabolischen Syndrom, werden diese Vermutungen aufklären müssen.

## 5. Zusammenfassung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) steht an der Spitze der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken westlicher Industrienationen. Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wurden neue Faktoren beschrieben, die eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose und assoziierten Komplikationen spielen könnten. Einer dieser Faktoren ist Adiponektin.

Adiponektin ist ein bioaktives Plasmaprotein, das in den Adipozyten exprimiert wird, eine Schlüsselrolle bei der Entstehung pro-atherogener Fettstoffwechselstörungen spielt und anti-inflammatorische, anti-atherosklerotische und insulinsensitivierende Eigenschaften besitzt. Adiponektin zirkuliert in komplexen multimeren Isoformen, von denen der „high-molecular-weight“(HMW)-Form der Hauptanteil der biologischen Aktivität und der protektiven Effekte bei Atherosklerose zugesprochen wird.

Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob durch Messung von HMW-Adiponektin und der Bestimmung des Quotienten aus HMW-Adiponektin/Adiponektin das koronarangiographische Ausmaß der KHK bei Männern vorausgesagt werden kann und, ob die Messung von HMW zukünftig einen klinischen Stellenwert in der Risikoprävention der KHK erreicht, der dem des Gesamtadiponektins überlegen sein könnte.

Eine zweite unabhängige Fragestellung zielte auf eine mögliche pharmakologische interventionelle Erhöhung von HMW-Adiponektin bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus ab. Hierfür wurde ein Statin ausgewählt (Atorvastatin), das erfolgreich in der Primär- und Sekundärprävention von Typ 2 Diabetikern eingesetzt wird und für das bekannt ist, dass es „cholesterin-unabhängige“ sog. pleiotrope Effekte besitzt.

In einer Querschnittsstudie wurde die HMW-Adiponektinkonzentration im Serum von 240 Patienten analysiert, die sich einer elektiven Koronarangiographie

## Zusammenfassung

unterzogen. Der Schweregrad der KHK wurde mit Hilfe angiographischer Scores festgelegt und diese mit den HMW-Spiegeln korreliert.

Eine Interventionsstudie wurde mit 75 Typ 2 Diabetikern durchgeführt, die in einer 2:1 Verteilung 40 mg/d Atorvastatin (n=52) oder ein Placebo (n=23) für die Dauer von 8 Wochen erhielten. Die Adiponektinkonzentration und Multimerverteilung wurde vor und nach Therapie ermittelt.

In der Querschnittsstudie zeigt sich eine hochsignifikante bivariate Korrelation zwischen HMW-Adiponektin und dem Ausmaß der KHK in allen drei angewandten Scores (Severity-, Gensini-, Extent-Score) (alle  $p < 0,01$ ). Eine Abnahme der HMW-Konzentration geht mit einer signifikante Zunahme des relativen Risikos für prävalente KHK einher und in multivariablen adjustierten Analysen ist HMW-Adiponektin mit der einflussreichste Prädiktor für das Ausmaß der KHK im Extent-Score ( $t = -5,250$ ;  $p < 0,001$ ). *Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Atherosclerosis 2008 July; 199(1):123-128,2008 veröffentlicht.*

In der Interventionsstudie zeigt sich nach 8-wöchiger Behandlung mit 40 mg Atorvastatin/d ein signifikanter Anstieg der HMW-Adiponektinkonzentration um 42,3 % (1,68 vs. 2,39  $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0,001$ ). *Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Clinical Endocrinology 2009 July; 71(1):27-32 veröffentlicht.*

Diese Ergebnisse zeigen, dass HMW-Adiponektin unabhängig von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren negativ mit dem Ausmaß einer KHK assoziiert ist und unterstützen die Hypothese, dass HMW-Adiponektin direkte Effekte auf frühe Initialschritte der Atherogenese vermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigen weiter, dass sich die HMW-Adiponektinkonzentration signifikant durch Statingaben steigern lässt.

Zusammengefasst ist HMW-Adiponektin ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor und ist eng mit dem Ausmaß der koronaren Atherosklerose vergesellschaftet. In der kardiovaskulären Prävention könnte HMW-Adiponektin zukünftig ein viel versprechendes Target pharmakologischer Interventionen sein und als Bindeglied in der adipo-vaskulären Achse verstanden werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Abbasi F, Chu J W, Lamendola C et al.: Discrimination between obesity insulin resistance relationship with adiponectin. *Diabetes* 53: 585- 590, 2004
- (2) Adams Mark R., Nakagomi Akihiro, Keech Antony, Robinson Jacqui, Mc Credie Robyn, Bailey Brian P., Freedman S. Ben, Celermayer David: Carotid intima-media Thickness is only weakly correlated with the extent and severity of coronary artery disease. *Circulation* 94: 2311-2, 1996
- (3) Al Suwaidi J, Higano ST, Holmes DR, et al.: Obesity is independently associated with coronary endothelial dysfunction in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 27: 1523-1528, 2001
- (4) Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79-83, 1999
- (5) Aso Y, Yamamoto R, Wakabayashi S, Uchida T, Takayanagi K, Takebayashi K, Okuno T, Inoue T, Node K, Tobe T, Inukai T, Nakano Y: Comparison of serum high-molecular –weight adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetes patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes* 55: 5-1525, 2006
- (6) Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, et al.: Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 200-206, 2004

- (7) Berg A H, Combs T P, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947- 953, 2001
- (8) Bobbert Thomas, Rochlitz Helmut, Wegewitz Uta, Akpulat Suzan, Mai Knut, Weickert Martin O. , Möhlig Matthias, Pfeiffer Andreas F.H., and Spranger Joachim: Changes of Adiponectin Oligomeric Composition by Moderate Weight Reduction. *Diabetes* 54: 2712-2719, 2005
- (9) Braissant O., Fougère F., Scotto C., Dauca M., Wahli W.: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354, 1996
- (10) Chandran M, Phillips S A, Ciaraldi T, Henry R R: Adiponectin: More than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* Vol. 26, No 8, 2003
- (11) Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al.: Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 45021-45026, 2003
- (12) Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B.: Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 151-8, 2004
- (13) Civitarese A E, Jenkins C P, Richardson D et al.: Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47: 816-820, 2004

- (14) Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, et al.: Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46: 459-468, 2003
- (15) Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH; Chard investigators: Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 364: 685-696, 2004
- (16) Combs T P, Berg A H, Obici S, Scherer P E, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108: 1875-1881, 2001
- (17) Combs T P, Berg A H, Rajala M W, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron J C, Patti M E, Klein S L , Weinstein R S, Scherer P E: Sexual differentiation , pregnancy, calorie restriction and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52: 268-276, 2003
- (18) Crouch E, Persson A, Chang D, Heuser J: Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J Biol Chem* 269: 17311- 17319, 1994
- (19) Delaigle A M, Jonas J C, Bauche I B, Cornu O, Brichard S M: Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 145: 5589- 5597, 2004
- (20) Ebinuma Hiroyuki, Miyazaki Osamu, Yago Hirokazu, Hara Kazuo, Yamauchi Toshimasa, Kadowaki Takashi: A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta* 10270, 2006

- (21) Endres M Statins: potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl.* 7: 31-35, 2006
- (22) von Eynatten M. Hamann A.: Adipokine und Lipidstoffwechsel bei Typ-2-Diabetes. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 132: 1-5, 2007
- (23) von Eynatten M., Hamann A., Twardella D, et al.: Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem* 52: 853-859, 2006
- (24) von Eynatten M, Schneider J G: The role of adiponectin in atherosclerosis: do lipids tip the scale? *Future Cardiology* 1: 775-784, 2005
- (25) von Eynatten M, Schneider J G, Humpert P M Kreuzer J, Kuecherer H, Katus H A, Nawroth P P, Dugi K A: Serum adiponectin levels are an independent predictor of the extent of coronary artery disease in men. *Journal of the American College of Cardiology* 47: 735-1097, 2006
- (26) Fantuzzi Giamilia, Mazzone Theodore: Adipose Tissue and Atherosclerosis, Exploring the Connection, *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 27: 996-1003, 2007
- (27) Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1084-1089, 2002
- (28) Friedman J M: Obesity in the new millennium. *Nature* 404: 632-634, 2000
- (29) De Fronzo R.A., Tobin J.D., Adres R.: Glucose clamp technique : a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* 237: 214-223

- (30) Furukawa K, Hori M, Ouchi N, et al.: Adiponectin down-regulates acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 831-836, 2004
- (31) Gianturco SH, Bradley WA, Gotto AM, et al.: Hypertriglyceridemic very low density lipoproteins induce triglyceride synthesis accumulation in mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest* 70: 168-178, 1982
- (32) Grip O, Janciauskiene, Lindgren S: Atorvastatin activates PPAR- $\gamma$  and attenuates the inflammatory response in human monocytes. *Inflamm. Res.* 51: 58- 62, 2002
- (33) Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe Y, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Marsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T: Genetic variations in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51: 536-540, 2002
- (34) Ho YK, Brown MS, Goldstein JL: Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J Lipid Res* 21: 391-398, 1980
- (35) Hodenberg: Komplexe Effekte auf die Arterienwand; Statine-Cholesterinsenkung- antiarteriosklerotische Wirkung. *Cardiovasc* 1(6): 12, 2001
- (36) Hotamisligil G S: The role of THF- $\alpha$  and TNG receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245: 621-625, 1999
- (37) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al.: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-0, 2000

- (38) Hotta K, Funahashi T, Bodkin N L et al.: Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50: 1126- 1133, 2001
- (39) Hu E, Liang P, Spiegelman B M: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271: 10697- 10703, 1996
- (40) Kadowaki T, Yamauchi T: Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews* 26: 439-451, 2005
- (41) Kantartzis K, Rittig K, Balletshofer B, et al.: The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. *Clin Chem* 52: 1934-1042, 2006
- (42) Kappes A, Loffler G: Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumor necrosis factor alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Hormone Metab Res* 32: 548-554, 2000
- (43) Kaser S, Moschen A, Cayon A et al.: Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 54: 117-121, 2005
- (44) Kersten S., Desvergne B., Wahli W.: Roles of PPARs in health and disease, *Nature* 404: 421, 2000
- (45) Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik D L, Cnop M: Expression of adiponectin receptors in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1118- 1122, 2003

- (46) Kissebah A H, Sonnenberg G E, Myklebust J et al.: Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14478- 14483, 2000
- (47) Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, et al.: Adiponectin inhibits the binding of low-density lipoprotein to biglycan, a vascular proteoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 66-70, 2005
- (48) Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S et al.: Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 94: 27- 31, 2004
- (49) Konodo H, Shimomura I, Matsukawa Y et al.: Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51: 2325- 2328, 2002
- (50) Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al.: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277: 25863-6, 2002
- (51) Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al.: Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:85-9, 2003
- (52) Lara-Castro Christina, Fu Yuchang, Hong Chung B. and Timothy Garvey W.: Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 18: 263-270, 2007
- (53) Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein R L, Garvey W T: Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55: 249-259, 2006

- (54) McCormack F X, Pattanajitvilai S, Stewart J, Possmayer F, Inchley K, Voelker D R: The Cys intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J Biol Chem* 272: 27971- 27979, 1997
- (55) Maeda K, Okubo K, Shimomura I et al.: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221: 286-289, 1996
- (56) Meada N, Shimomura I, Kishida K et al.: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP 30. *Nat Med* 8: 731-737, 2002
- (57) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T et al.: PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099, 2001
- (58) Matsubara M, Maruoka S, Katayose S: Decreased plasma adiponectin concentrations in woman with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2764-2769, 2002
- (59) Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Konuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y: Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: the missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 277: 37487- 37491, 2002
- (60) Matsuzawa Yuji: Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atherosclerosis Supplements* 6: 7-14, 2005

- (61) Matthews D.R., Hosker J.P. et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985
- (62) Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D, et al. : Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 90: 528-33, 2004
- (63) Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura N H, Mazda T, Tomita M: Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120: 803-812, 1996
- (64) Okada T, Saito E, Kuromori Y, et al. : Relationship between serum adiponectin level and lipid composition in each lipoprotein fraction in adolescent children. *Atherosclerosis* 188: 179-183, 2006
- (65) Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P: Adiponectin: A key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science* 110: 267-278, 2006
- (66) Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al.: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106: 2767-70, 2002
- (67) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al.: Novel modulator of endothelial adhesion molecules : adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-6, 1999
- (68) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al.: Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103: 1057-63, 2001

(69) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.: Adiponecrin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial HF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102: 1296-1201, 2000

(70) Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, et al.: Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 42: 231-4, 2003

(71) Ouchi Noriyuki, Shibata Rei and Walsh Kenneth: Cardioprotection by Adiponectin. *Trends Cardiovasc Med* 16: 141-146, 2006

(72) Pajvani U B X, Combs T P et al.: Structure-Function Studies of the Adipocyte-secreted Hormone Acrp 30/Adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278: 9073-9085, 2003

(73) Pajvani U B, Hawkins M, Combs T P et al.: Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-12162, 2004

(74) Planavila A, Sanchez R M, Merlos M, Laguna J C, Vazquez-Carrera M: Atorvastatin prevents peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 (PGC-1) downregulation in lipopolysaccharide-stimulated H9c2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1736: 120-127, 2005

(75) Pischon T, Girman C J, Hotamisligil G S, Rifai N, Hu F B, Rimm E B: Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291: 291, 2004

(76) Puigserver P., Wu Z.D., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M.: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829, 1998

(77) Rosenfeld M.G., Glass C.K.: Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol. Chem.* 276: 36865, 2001

(78) Scherer H F, William S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746-26749, 1995

(79) Shapiro L, Scherer P E: The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8: 335-340, 1998

(80) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamaschita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y: Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2:800- 803, 1996

(81) Spiegelman B M, Flier J S, Adipogenesis and obesity: rounding out the picture. *Cell* 87: 377- 389 1996

(82) Spranger J, Kroke A, Mohlig M et al.: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228, 2003

(83) Staiger H, Kausch C, Guirguis A et al.: Induction of adiponectin gene expression in human myotubes by an adiponectin-containing HEK293 cell culture supernatant. *Diabetologia* 46: 956-960, 2003

(84) Steppan C M, Bailey S T, Bhat S, Brown E J, Benerjee R R, Wright C M, Patel H R, Ahima R S, Lazar M A: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307- 312, 2001

- (85) Tomas E, Tsao TS, Saha AK, et al.: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16309-16313, 2002
- (86) Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani U B, Kwon E, Weaver C, Scherer P E, Hawkins M: Mechanisms of early insuli-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1621-1629, 2004
- (87) Tsao T- S, Tomas E, Murry H E, et al.: Role of Disulfide Bonds in Acrp30/ Adiponectin Structure and Signaling Specificity: Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 278: 50810-50817, 2003
- (88) Tschritter O, Fritsche A, Thamer C et al.: Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 50: 1126-1133, 2001
- (89) Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y et al.: Insulin/foxo 1 pathway regulates expression levels adiponectin receptors adiponectin sensitivity. *J Bio Chem* 279: 30817-30822, 2004
- (90) Vionnet N, Hani E L, Dupont S et al.: Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 67: 1470- 1480, 2000
- (91) Waki H, Yamauchi T, Kamon J et al.: Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278: 40352-40363, 2003.

(92) Wang Y, Lam K S L, Chan L, Chan K W, Lam J B B, Lam M C, Hoo R C L, Mak W N, Cooper G J S, Xu A: Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* 24: 281, 2006

(93) Vasudevan A.R., Hamirani Y.S., Jones P.H.: Safety of statins: effects on muscle and the liver. *Cleve J Med* 72: 990-993, 996-1001, 2005

(94) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al.: Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930- 1935, 2001

(95) White R T, Damm D, Hancock N, Rosen B S, Lowell B B, Usher P, Flier J S, Spiegelman B M: Human adiponectin is identical to complement factor D and is expressed in high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* 267: 9210- 9213, 1992

(96) Whitehead J P, Richards A A, Hickman G, Macdonald G A, Prins J B: Adiponectin- a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 8: 264-280, 2006

(97) Wolk Robert, Berger Peter, Lennon Ryan J., Brilakis Emmanouil S., Somers Virend K. : A risk factor for unstable angina and myocardial infarction in patients with angiographically confirmed coronary artery disease. *Circulation* 108: 2206-2211, 2003

(98) Wong G W, Wang J, Hug C, Tsao T S, Lodish H F: A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10302- 10307, 2004

- (99) Wu X, Motoshima H, Mahadev K, et al.: Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52: 1355-1363, 2003
- (100) Yang W S, Lee W J, Funahashi T et al.: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin . *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3815- 3819, 2001
- (101) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S et al.: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769, 2003
- (102) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al.: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295, 2002
- (103) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al.: Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and Apo E-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278: 2461-8, 2003
- (104) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman M L, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946, 2001
- (105) Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, Tumer N, Scarpace P J: Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissue: Influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochem Biophys Acta* 1584: 115-122, 2002

(106) Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 472: 425-432, 1994

(107) Zietz B, Herfarth H, Paul G, et al.: Adiponectin represents an independent cardiovascular risk faktor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes. FEBS Lett 545: 103-4, 2003

(108) Zoccali C, Mallmaci F, Tripepi G, et al.: Adiponectin, metabolic risk factors and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol 13:134-41, 2002

(109) [http://www.idf.org/webdata/docs/IDF\\_Meta\\_def\\_final.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf)  
International Diabetes Federation, 2006

(110) [http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL\\_Klassifikation\\_Update\\_2004.pdf](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf)  
Deutsche-Diabetes-Gesellschaft, 2004

## Danksagung

- Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Allolio für die wissenschaftliche und klinische Leitung, die für die Erstellung meiner Arbeit sehr nützlich war.
- Herrn Prof. Dr. U. Walter danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.
- Besonderer Dank geht an Dr. med. M. von Eynatten für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.
- Sehr herzlich möchte ich meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern für die großzügige finanzielle und immerwährende moralische Unterstützung während meines Studiums danken.