

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ-Prof. Dr. D. Neumeier)

Löslicher CD40-Ligand im EDTA-Plasma verschiedener Patientenkollektive

Carola Jaschul

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H.H.E. Baum
2. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 23.06.2009 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009
angenommen.

Gliederung

Gliederung

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Fragestellung.....	12
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Patienten.....	13
3.1.1	Übersicht.....	13
3.1.2	Erkrankungen in den einzelnen Diagnosegruppen.....	14
3.1.3	Ein- und Ausschlusskriterien.....	16
3.2	Material.....	17
3.2.1	Proben.....	17
3.2.1.1	Rekrutierung.....	17
3.2.1.2	Probenmaterial.....	17
3.2.2	Messprinzip (Testprinzip).....	17
3.2.3	Thrombozytenbestimmung.....	18
3.3	Messung der sCD40L-Konzentration.....	19
3.3.1	Kalibration und Qualitätskontrolle.....	19
3.3.2	Familiarisierung.....	20
3.3.2.1	Erstellung der Plasmapools.....	20
3.3.2.2	Durchführung der Familiarisierung.....	20
3.3.3	Probenmessung.....	21
3.4	Statistische Methoden.....	21
3.4.1	Mann-Whitney-Test.....	21
3.4.2	Korrelationsanalyse.....	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Deskriptive Datenanalyse.....	23
4.1.1	Gesamt.....	23
4.1.2	Gruppe 1.....	23
4.1.3	Gruppe 2.....	24
4.1.4	Gruppe 3.....	25
4.1.5	Gruppe 4.....	25
4.1.6	Gruppe 5.....	26
4.1.7	Gruppe 6.....	27
4.1.8	Gruppe 7.....	27
4.1.9	Gruppe 8.....	28
4.1.10	Gruppe 9.....	28
4.1.11	Gruppe 10.....	29
4.1.12	Übersicht.....	30
4.2	Vergleich der Diagnosegruppen.....	31

4.3	Vergleich der Geschlechter	31
4.4	Vergleich der Altersgruppen.....	32
4.4.1	Deskriptive Datenanalyse	32
4.4.2	Vergleich der Altersgruppen.....	32
4.5	Vergleich mit der Thrombozytenzahl	33
5	Diskussion	35
5.1	Der sCD40 Ligand als Parameter für Herz-Kreislaufkrankungen	35
5.2	sCD40L in diesen Untersuchungen.....	36
5.2.1	Ergebnisse der Referenzgruppe	36
5.2.2	Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen.....	37
5.2.2.1	Patientenkollektiv und Werte.....	37
5.2.2.2	Mögliche Ursachen für niedrige sCD40L-Konzentrationen	38
5.2.3	Patienten dieser Studie mit erhöhten Werten.....	39
5.2.3.1	Vorliegende Erkrankungen.....	39
5.2.3.2	Mögliche Ursachen für vorliegende sCD40L-Konzentrationen.....	40
5.2.4	sCD40L-Konzentrationen im Gesamtkollektiv dieser Studie	41
5.3	Unterschiede zwischen einzelnen Studiengruppierungen	42
5.3.1	Vergleich der Diagnosegruppen.....	42
5.3.2	Vergleich der Geschlechter und der Altersgruppen.....	42
5.3.3	Vergleich mit der Thrombozytenzahl.....	43
5.4	Problematik des sCD40L.....	44
5.4.1	Schwierigkeiten bei der Bestimmung des sCD40L.....	44
5.4.2	Rolle und Funktion des sCD40L.....	45
5.5	sCD40L und andere Biomarker bei akutem Koronarsyndrom	47
6	Zusammenfassung	49
7	Literaturverzeichnis	51
8	Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ASS	Acetylsalicylsäure
CD4	Cluster of differentiation 4
CD40L	CD40-Ligand
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Gp IIb/IIIa Rezeptor	Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor
HMG-CoA-Reduktasehemmer	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmer
IFN- γ	Interferon γ
IL-6	Interleukin 6
LDL-Cholesterin	low density lipoprotein Cholesterin
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix Metalloproteinasen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
oxLDL-Cholesterin	oxidiertes LDL-Cholesterin
PAPP-A	Pregnancy Associated Plasma Protein A
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
sCD40L	soluble CD40-Ligand
TF	Tissue Factor
Th1	T-Helferzellen Typ 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrieländern (2). Sie entstehen im komplexen Zusammenspiel von Fettstoffwechsel, Gerinnungssystem, Zytokinen, hämodynamischem Stress und individuell beeinflussbaren Risikofaktoren wie Ernährungs- und Rauchverhalten (43). Als Folge dieses Krankheitsprozesses treten nicht selten Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall mit möglichem tödlichem Ausgang auf.

Die Pathogenese der Arteriosklerose ist ein Themenkomplex, der bereits in einer Vielzahl von Studien ausführlich diskutiert wurde. Zunächst war das Hauptaugenmerk auf die Rolle der Lipide, vornehmlich das oxLDL-Cholesterin, gerichtet. Im Laufe der Zeit kristallisierte sich jedoch zunehmend heraus, dass auch die Thrombozyten und deren Aktivierung und Aggregation bei der Entstehung von thrombotischen ischämischen Ereignissen eine entscheidende Rolle spielen. Heute versteht man die Arteriosklerose als einen durch Entzündungsvorgänge verursachten Prozess, an dem verschiedenste Zellen wie Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten beteiligt sind (4). Den klassischen Entzündungsparametern wie CRP oder IL-6 wird bereits eine ähnliche Aussagekraft wie zum Beispiel oxLDL-Cholesterin in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko zugeschrieben (4, 42).

Einer dieser Entzündungsparameter ist der CD40-Ligand (CD40L), der in der Interaktion mit dem CD40-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose spielt (62).

Der CD40L ist ein strukturell zur Familie der Tumornekrosefaktoren zählendes Transmembranprotein, das seine Wirkung nach Freisetzung schnell entfaltet (29). Erstmals wurde diese Struktur auf Zellen des Immunsystems, wie aktivierten CD4 positiven T-Lymphozyten, Mastzellen, basophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und NK-Zellen, identifiziert (4) und galt als essentiell für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems (25). So spielt er beispielsweise eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen T-Lymphozyten, welche CD40L exprimieren, und B-Lymphozyten, welche den zugehörigen Rezeptor ausbilden (72). Neben seiner proinflammatorischen Funktion wurde auch ein proatherogener und prothrombotischer Effekt des CD40L nachgewiesen. Außer T-Lymphozyten und anderen Immunzellen exprimieren auch Endothelzellen und Thrombozyten den

CD40L (60). In unstimulierten Plättchen liegt CD40L in einer kryptischen Form vor, wird aber bei Aktivierung sehr schnell an der Oberfläche exprimiert (28). Hier wird er proteolytisch in einen membrangebundenen und einen löslichen Anteil gespalten (29); in seiner löslichen Form, als sogenannter soluble CD40-Ligand (sCD40L), kann er im Plasma nachgewiesen werden (67) und ist in dieser Form auch biologisch aktiv (24). Der weitaus größte Anteil des im Plasma nachweisbaren sCD40L stammt erwiesenermaßen von aktivierten Thrombozyten (4). Dabei spielt der sCD40L in der Pathogenese der Arteriosklerose bei unterschiedlichen Prozessen eine Rolle (9).

Zunächst sind der sCD40L und sein Rezeptor neben anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise IL-6 oder IFN, an der Induktion einer Th1-Immunantwort beteiligt (47): Neben der direkten Aktivierung von T-Lymphozyten und Endothelzellen durch den sCD40L (33) werden letztere auch zur Ausschüttung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen angeregt. Diese wiederum locken CD4 positive T-Lymphozyten und andere Immunzellen an und aktivieren diese (28), während Thrombozyten zur Aggregatbildung mit Monozyten angeregt werden (8). Mach et al. bezeichnen die T-Zellen sogar als „Orchestrator of atherogenesis“ und deren freigesetzte Mediatoren, wie beispielsweise den sCD40L, als die entscheidenden proinflammatorischen Stimuli für die an der Atherombildung beteiligten Zellen (43).

Mit der weiteren Ausschüttung von Botenstoffen und Entzündungsmediatoren verstärkt sich das prokoagulatorische Milieu am Endothel (47): Die zytokin-induzierte Entzündungsreaktion wird im Entstehungsprozess arteriosklerotischer Plaques als initial angesehen, da sie eine Aktivierung von Monozyten bewirkt, welche durch die Oxidation von LDL den Grundstein für die Entstehung von Atheromen legen (60). Die relativ höchsten Konzentrationen an sCD40L finden sich in dieser Phase der initialen Plaqueausbildung (54).

Zusätzlich zu den bereits zirkulierenden Entzündungsmediatoren wird durch die CD40L-vermittelte Interaktion zwischen Immun- und Endothelzellen auch Tissue Factor (TF) frei gesetzt, welcher als potentester Initiator der Gerinnungskaskade gilt (47).

Somit lässt sich der sCD40L als ein ursächlicher und sehr früh im Ablauf eines Entzündungsprozesses wirkender Faktor (47) definieren. Zusätzlich regt er glatte Muskelzellen zur Proliferation sowie das Gewebe über die Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Neovaskularisation an und hat außerdem die

Fähigkeit, weitere Thrombozyten über deren Glykoprotein IIb/IIIa (gp IIb/IIIa-) Rezeptor zu aktivieren (58).

Durch die beiden Komponenten seines Wirkungsspektrums lässt sich der Biomarker daher als Bindeglied zwischen thrombotischen und inflammatorischen Phänomenen in der Atherogenese definieren (2).

Der sCD40L ist auch in die Entstehung eines akuten Koronarsyndroms (ACS), das durch die Ruptur einer instabilen atherosklerotischen Plaque in den Koronararterien zustande kommt, involviert. Infiltrieren Makrophagen und andere Immunzellen wie Lymphozyten die Endothelwand und stehen in Kontakt zu den Plaques, so führt dies zu einem Substanz- und Stabilitätsverlust von Endothelwand und Bindegewebe. Eine entscheidende Rolle in diesem aktiven Entzündungsprozess spielen die Matrix Metalloproteinasen (MMPs), deren Freisetzung wiederum durch den sCD40L getriggert wird (9). Vor allem die Aktivierung von MMP-9 hat eine strukturelle Destabilisierung (59) und daraufhin eine Ruptur der instabilen Plaque zur Folge, wodurch erneut sCD40L frei gesetzt und von bisher nicht aktivierten Thrombozyten gebunden wird. Diese Bindung von sCD40L resultiert schließlich in der Aktivierung der Thrombozyten (60).

Die Ansätze, einen experimentellen Beweis für die in-vivo-Rolle des sCD40L im Arteriosklerose-Prozess zu finden, sind vielfältig:

Mäuse mit einer CD40L-Gendeletion zeigten in einer Studie eine verminderte Stabilität arterieller Thromben sowie einen verzögerten arteriellen Verschluss. Die Infusion von CD40L normalisierte die thrombotische Funktion (5). In einer anderen Studie verhinderte die Verabreichung von CD40L-Antikörpern in LDL-Cholesterin-Rezeptor-negativen Mäusen die Progression einer Arteriosklerose (44). Die proinflammatorische Rolle des sCD40L für die Entstehung der Arteriosklerose unterstreicht auch folgender Befund: Bei der genaueren Analyse arteriosklerotischer Plaques finden sich T-Lymphozyten, die CD40L exprimieren, während sich in gesunden Personen jedoch keinerlei CD40L-positive Zellen nachweisen lassen (45).

Die genauere Betrachtung der Proteinstruktur des sCD40L gibt Aufschluss über seine Funktion. Die prothrombotische Aktivität beruht auf der Fähigkeit des Moleküls, an den gpIIb/IIIa-Rezeptor von Thrombozyten zu binden (5) und damit durch Phosphorylierung der β_3 -Untereinheit und intrathrombozytäre Signaltransduktion die Ausbildung stabiler Plättchenaggregate zu induzieren (52), wohingegen der

proinflammatorische Effekt seinen Ursprung in der Tumornekrosefaktor-ähnlichen Strukturdomäne hat (49). In Untersuchungen mit einer Zellreihe undifferenzierter Monozyten wurde ein weiterer Rezeptor, das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, entdeckt, welcher durch die Aktivierung durch CD40L die Expression von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und IFN- γ in diesen Zellen bewirkt (39).

Auf Grund dieser dargestellten Eigenschaften des sCD40L konzentriert sich nun die Aufmerksamkeit auf die klinische Bedeutsamkeit sowie auf die Frage, inwieweit dem Nachweis des Parameters eine klinische Bedeutung zukommt. Die Hoffnung liegt vor allem in einer verbesserten Risikostratifizierung von Patienten mit instabiler Angina pectoris (2). Ein erhöhter sCD40L-Wert soll bei Patienten mit ACS das Auftreten eines AMI und einen plötzlichen Herztod vorhersagen können (60) da er als ein Marker der Thrombozytenaktivierung bereits vor den bei Myokardnekrosen nachweisbaren kardialen Troponinen ansteigt (11). Auch Apple et al. sehen im sCD40L einen viel versprechenden Marker für Diagnosestellung und Risikoevaluierung eines kardialen ischämischen Ereignisses, dessen klinischer Nutzen neben einigen anderen kardiovaskulären Biomarkern allerdings noch in Studien geprüft werden soll. Demzufolge gibt eine sCD40L-Erhöhung, neben der Funktion als Indikator eines bestehenden Thromboserisikos, einen Hinweis auf Plaque-Instabilitäten bei akutem Koronarsyndrom (6). Dies zeigte auch eine Untersuchung an Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris. Es fanden sich signifikant höhere sCD40L Konzentrationen bei Studienteilnehmern mit instabiler Angina pectoris im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris und gesunden Kontrollpersonen (9). Ebenso scheint ein erhöhter sCD40L Wert ein prospektiver Marker im Rahmen der Risikostratifizierung nach einem ACS zu sein, da in einer Untersuchung jene Patienten mit im Verlauf erneutem kardialem Ereignis bei der Erstuntersuchung signifikant höhere sCD40L Plasmakonzentrationen aufwiesen (63). Doch auch bei klinisch bisher unauffälligen Patienten scheint die sCD40L-Konzentration eine Rolle zu spielen: Schönbeck et al. stellten in ihrer Analyse von 28263 Frauen mittleren Alters ohne bisherige kardiovaskuläre Risikofaktoren bei einer sCD40L-Konzentration oberhalb der 99. Perzentile ($>5,54$ ng/ml) ein signifikant erhöhtes Risiko für ein zukünftiges kardiovaskuläres Ereignis fest (55). Auch in einer Studie an Patienten mit ACS wurde der positive prädiktive Wert von sCD40L-Konzentrationen über einer Konzentration von 5 ng/ml bestätigt und damit auch die

Auffassung, dass der sCD40-Ligand ein Marker einer inflammatorischen thrombotischen Aktivität ist (27).

Des Weiteren wurde die Wirkung einiger Medikamente auf die sCD40L-Plasmakonzentration genauer untersucht. Zahlreiche antithrombozytäre Medikamente wie Clopidogrel[®], das die Adenosindiphosphat (ADP)-abhängige Aktivierung der Thrombozyten inhibiert oder Abciximab[®], welches eine Stimulation der Plättchen über das gpIIb/IIIa verhindert, wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die sCD40L-Expression untersucht. Es zeigt sich, dass diese Rezeptorantagonisten scheinbar einheitlich neben einer Hemmung der Thrombozytenfunktion auch die Freisetzung des sCD40L inhibieren (49). Die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) zeigt ebenso Auswirkungen auf die Ausschüttung dieses Biomarkers; hier konnte ein 50%iger Rückgang der sCD40L Freisetzung aus mit Kollagen stimulierten Plättchen gezeigt werden. Einen additiven Effekt auf die Plättchenaktivität entdeckten Vavuranakis et al. bei einer Kombinationstherapie aus Clopidogrel[®] und ASS: die Medikation mit beiden Medikamenten inhibiert die Plättchenaktivierung, als deren Maß in ihrer Studie unter anderem eine erhöhte sCD40L-Konzentration galt, und vermindert damit das Risiko für ein akutes Koronarsyndrom stärker als die alleinige Therapie mit ASS (65).

Wie gezeigt wurde, ist der sCD40L auf komplexe Weise in den pathophysiologischen Entstehungsprozess der Arteriosklerose involviert. Somit ist es nicht verwunderlich, dass sich erhöhte Konzentrationen auch bei anderen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems finden lassen. So ist die essentielle Hypertonie – sie gilt als einer der Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose – mit einem signifikanten Anstieg des sCD40L-Levels assoziiert. Daher scheint die arterielle Hypertonie auch eine inflammatorische Komponente zu besitzen (71). Gleiches gilt für Erkrankungen, die zu den Spätfolgeschäden der Arteriosklerose zählen: Beispielsweise sind, wie Lee et al. fanden, eine weit fortgeschrittene periphere arterielle Verschlusskrankheit (37) oder eine Carotisstenose (12) mit erhöhten sCD40L-Werten verbunden. Auch bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz sind erhöhte sCD40L Konzentrationen nachweisbar: Die Konzentration von sCD40L steigt bereits zu Beginn der Erkrankung an und bleibt auch im Verlauf konstant erhöht. Dabei ist die Höhe des Wertes signifikant mit dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz korreliert. Die Freisetzung des Mediators ist auch hier vor allem auf eine gesteigerte Plättchenaktivierung zurück zu führen (61).

Auch scheint der sCD40L für die Verlaufskontrolle nach invasiven Untersuchungen und Interventionen bei Herzpatienten von Relevanz zu sein. Bei Operationen am offenen Herzen mit extrakorporaler Zirkulation fand sich ein bis zu 4-facher Konzentrationsanstieg des sCD40L. Diese Konzentrationen normalisierten sich aber bei komplikationsfreiem Verlauf innerhalb von 8 Stunden postoperativ wieder (50). Bei der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) oder der Implantation eines koronaren Stentes fanden Aukrust et al. ebenso erhöhte Konzentrationen von sCD40L (10). Steigt der jeweilige Plasmaspiegel innerhalb eines Monats post interventionem anstelle eines Abfalls wieder an, so gilt dies als prädiktives Zeichen für die Entwicklung einer Restenose der Koronarie innerhalb eines halben Jahres (34).

Durch das fast ubiquitäre Vorkommen von CD40L sind neben kardiovaskulären auch eine ganze Reihe anderer Erkrankungen als mögliche Ursachen einer Konzentrationserhöhung denkbar. Bei einer Reihe maligner Erkrankungen wie soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen fanden sich erhöhte CD40L Konzentrationen, wobei ihm hier Anti-Tumor Effekte, wie beispielsweise durch seine Bindung vermittelte Zytotoxizität oder die Aktivierung von Apoptose-Programmen, zugeschrieben werden (20). Ebenso fand sich eine Beteiligung des sCD40L bei Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes (14) und systemischer Sklerose (3). Doch auch bei metabolisch bedingten Erkrankungen wie dem Typ 2 Diabetes mellitus scheint der sCD40L eine Rolle zu spielen. So verursacht auch hier eine vermehrte Thromboxan-induzierte Plättchenaktivierung, die neben weiteren chronischen Entzündungsreizen sowohl in die Pathogenese als auch in die Entwicklung von Komplikationen des Typ 2 Diabetes mellitus involviert ist, einen Anstieg der sCD40L- Konzentration (53). Dementsprechend ist auch ein metabolisches Syndrom, bestehend aus Dyslipoproteinämie, Glukosetoleranzstörung, essentieller Hypertonie und stammbetonter Adipositas mit erhöhten Serumwerten an sCD40L assoziiert (38). Gleiche Effekte konnten sogar bereits bei Kindern von Eltern mit metabolischem Syndrom nachgewiesen werden: sCD40L-Konzentrationen korrelierten positiv mit den einzelnen Komponenten dieser Erkrankung (1). Neuere Untersuchungen schreiben dem Biomolekül sogar eine mögliche pathogenetische Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung zu: es wurden signifikant höhere Spiegel von sCD40L im Plasma dieser Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gefunden (18).

Sehr unterschiedlich und vielseitig bedingt scheinen demnach Expression und Freisetzung dieses Proteins; gleiches gilt für seine Funktionsweise als Mediator im Entzündungsgeschehen.

2 Fragestellung

Die in der Einleitung diskutierten pathophysiologischen Eigenschaften des CD40L sowie seiner löslichen Form legen den Schluss nahe, dass dieses Biomolekül an verschiedensten Interaktionen beteiligt ist und eine wichtige Rolle beim Signaltransfer spielt. Zunächst bleibt durch seine komplexe Beteiligung am Entzündungsgeschehen im Entstehungsprozess der Arteriosklerose relativ unklar, ob der sCD40L eher als Indikator oder vielmehr als Konsequenz einer kardiovaskulären Erkrankung aufgefasst werden soll. Zum einen lässt sich eine Konzentrationserhöhung schon bei einem subklinischen thrombotischen Ereignis vor dem Auftreten einer kardialen Komplikation nachweisen, zum anderen findet sich ein Anstieg des sCD40L in Folge von Plaqueinstabilitäten bei manifester instabiler Angina pectoris. Zudem scheint dieses Biomolekül in zahlreiche andere Prozesse involviert zu sein und bei vielen anderen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Neben seiner möglichen Funktion als Marker gibt der sCD40L auch Hoffnung auf ein therapeutisches Potenzial: durch Modulation seiner Signalwege ergeben sich möglicherweise Therapiemöglichkeiten für die Arteriosklerose oder ein Einfluss auf immunologische Prozesse.

Der sCD40L lässt somit momentan bezüglich seines Vorkommens und seiner Funktionen in der Pathophysiologie verschiedenster Erkrankungen noch viele Fragen offen (54). Ziel dieser Studie ist es, sCD40L-Konzentrationen im Blut von verschiedenen Patientenkollektiven zu untersuchen sowie in einem gesunden Kontrollkollektiv einen vorläufigen Referenzbereich zu ermitteln, um einen ersten Anhalt über einen potenziellen klinischen Nutzen dieses viel diskutierten Proteins zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Übersicht

In die Studie wurden insgesamt 443 Patienten aufgenommen, die sich im Zeitraum von Dezember 2005 bis Juli 2006 im Klinikum rechts der Isar in stationärer oder ambulanter Behandlung befanden. Anhand der Aufnahmediagnose erfolgte eine Zuordnung zu folgenden Gruppen:

1	Kardiovaskuläre und kardiale Erkrankungen	68 Patienten
2	Maligne Erkrankungen	77 Patienten
3	Benigne gastrointestinale Erkrankungen	70 Patienten
4	Benigne hepatische Erkrankungen	75 Patienten
5	Benigne pulmonale Erkrankungen	6 Patienten
6	Benigne renale Erkrankungen	35 Patienten
7	Metabolische und endokrine Erkrankungen	25 Patienten
8	Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis	1 Patient
9	Akute und chronische Infektionen	16 Patienten
10	Kontrollgruppe gesunder Probanden	70 Probanden

Entsprechend der Diagnosegruppen ergab sich ein nicht über alle Gruppen gleich verteiltes Patientenprofil. So waren beispielsweise in der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen (Gruppe 1) über die Hälfte der Patienten männlich mit einem Durchschnittsalter von ca. 65 Jahren. Im Vergleichskollektiv hingegen lag der Altersdurchschnitt dagegen bei 24 Jahren, die Geschlechterverteilung war hier ausgewogen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Verteilung der Patienten in den einzelnen Gruppen.

Tabelle 1 – Charakteristik der Patienten der einzelnen Gruppen

Gruppe	Anzahl	Alter	Geschlecht (m/w)
1	68	68 (23-96)	43 / 25
2	77	57 (20-85)	38 / 39
3	70	45,5 (19-91)	41 / 29
4	75	48 (19-79)	34 / 41
5	6	63 (39-67)	2 / 4
6	35	48 (29-80)	18 / 17
7	25	52 (29-80)	7 / 18
8	1	24	- / 1
9	16	44 (32-79)	10 / 6
10	70	24 (19-56)	36 / 33

Alter als Median angegeben, in Klammern ist die Spannweite aufgeführt.

3.1.2 Erkrankungen in den einzelnen Diagnosegruppen

In der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen (Gruppe 1) überwogen Patienten mit einer koronarer Herzerkrankung sowie Herzrhythmusstörungen, bei den Patienten mit malignen Erkrankungen (Gruppe 2) stellten Diagnosen aus dem hämatoonkologischen Formenkreis den Hauptteil. Zu den benignen gastrointestinalen Erkrankungen (Gruppe 3) zählten hauptsächlich Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, während sich in der Gruppe der benignen hepatischen Erkrankungen (Gruppe 4) vorwiegend Patienten mit Hepatitiden fanden. Gemischt war das relativ kleine Patientenkollektiv in der Gruppe der benignen pulmonalen Erkrankungen (Gruppe 5), die Gruppe der benignen renalen Erkrankungen (Gruppe 6) beinhaltete vorwiegend Patienten nach Nierentransplantation und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Bei den metabolischen und endokrinen Erkrankungen (Gruppe 7) fanden sich hauptsächlich Patienten mit Störungen der hormonellen Homöostase. Zur Gruppe der rheumatischen Erkrankungen (Gruppe 8) ließ sich nur eine

Patientenprobe zuordnen, in der Gruppe der Patienten mit Infektionserkrankungen (Gruppe 9) fanden sich neben akuten viralen und bakteriellen Infekten auch solche mit einer chronischen HIV-Infektion.

Teilnehmer des gesunden Vergleichskollektives (Gruppe 10) durften laut Studienprotokoll keine dieser Diagnosen oder andere, im nächsten Abschnitt benannte Ausschlusskriterien aufweisen.

Eine detaillierte Übersicht der Patienten in den einzelnen Gruppen gibt Tabelle 2.

Tabelle 2 – Übersicht der Diagnosen in den einzelnen Gruppen

Gruppe	Anzahl	Diagnose	Anzahl
1 Kardiovaskuläre und kardiale Erkrankungen	68		
		Koronare Herzkrankheit	49
		Herzrhythmusstörung	11
		Hypertonus	4
		Kardiomyopathie	1
		Lungenembolie	1
		Carotisstenose	1
	1	1	
2 Maligne Erkrankungen	77		
		Hämatookologische Erkrankungen	35
		Gastrointestinale Tumoren	12
		Mesenchymale und dermatologische Tumoren	8
		Bronchialcarzinom	7
		Urologische und gynäkologische Tumoren	5
		Pharyngeale Tumoren	3
		Mammacarzinom	3
		Zerebrale Tumoren	2
Osteosarkom	2		
3 Benigne gastrointestinale Erkrankungen	70		
		Morbus Crohn	19
		Colitis ulcerosa	14
		Gastroösophageale Refluxkrankheit	13
		Verdauungsbeschwerden, Bauchschmerzen	11
		Pankreatitis	3
		Divertikulose und Divertikulitis	4
		Gutartige Neubildungen	3
		Gallensteine und Entzündungen der Gallenwege	2
		Verätzung des Ösophagus	1

Gruppe	Anzahl	Diagnose	Anzahl
4 Benigne hepatische Erkrankungen	75	Hepatitis, viral	44
		Hepatomegalie und Steatosis hepatis	12
		Autoimmunhepatitis	5
		Leberzirrhose	5
		Leberenzymhöhung	4
		Biliäre Zirrhose und sklerosierende Cholangitis	4
		Echinokokkose	1
5 Benigne pulmonale Erkrankungen	6	Pneumonie	2
		Chronisch Obstruktive Lungenerkrankungen	3
		Pneumothorax	1
6 Benigne renale Erkrankungen	35	Zustand nach Nierentransplantation	17
		Niereninsuffizienz	14
		Nierenversagen	3
		Stauungsniere	1
7 Metabolische und endokrine Erkrankungen	25	Schilddrüse	7
		Nebenschilddrüse	7
		Störungen des Glucosestoffwechsels	4
		Nebennierenrinde	3
		Hypophyse	3
		Störungen des Fettstoffwechsels	1
8 Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis	1	Idiopathische Thrombozytopenische Purpura	1
9 Akute und chronische Infektionen	16	Akute Infektionen, bakteriell und viral	8
		HIV	7
		Entzündliche Geschehen	1
10 Gesundes Vergleichskollektiv	70		

3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten (weiblich oder männlich) ab dem 18. Lebensjahr mit einer Hauptdiagnose aus einem der oben genannten Diagnosefelder. Konnte ein Patient mehr als einer der Diagnosegruppen (zum Beispiel Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Malignom) zugeordnet werden, so wurde er nicht in die Studie aufgenommen. Zu den Ausschlusskriterien des gesunden Vergleichskollektivs gehörten Schwangerschaft, Verbrennungen oder Muskeltraumata, Einnahme verschreibungspflichtiger Arzneimittel (ausschließlich hormoneller Kontrazeptiva) sowie Operationen innerhalb der letzten sechs Monate.

3.2 Material

3.2.1 Proben

3.2.1.1 Rekrutierung

Die Proben entstammten der allgemeinen täglichen Routinediagnostik im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie. Das benötigte EDTA-Plasma fiel aus Restblut der täglich auf den Stationen abgenommenen Blutbildröhrchen an, welches routinemäßig in das Institut für Klinische Chemie gesandt wurde.

Die freiwilligen Probanden der Kontrollgruppe füllten einen Fragebogen bezüglich ihrer Vorerkrankungen, Medikation und persönlichen Angaben sowie eine Einverständniserklärung aus.

Die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar erteilte ihr positives Votum im November 2005.

3.2.1.2 Probenmaterial

Für die Bestimmung des sCD40L erwies sich EDTA-Plasma als günstigstes Probenmaterial (69). In durchgeführten Studien zeigte sich in Serumproben eine um ein vielfaches erhöhte sCD40L-Konzentration als in EDTA- oder Citratplasma bedingt durch die Freisetzung aus den Thrombozyten im Zuge des Gerinnungsvorgangs. Daher wird Plasma für die Bestimmung dieses Biomoleküls bevorzugt (63).

Zur Gewinnung des benötigten Plasmavolumens wurden die EDTA-Plasmaproben mit 2750 x g bei 2-8°C 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma von den korpuskulären Blutbestandteilen abpipettiert, in zwei Aliquots zu je 300µl gegeben und umgehend bei -20°C eingefroren. Werden die Proben konstant tiefgekühlt, ist der Analyt über einen längeren Zeitraum stabil (26). Wiederholtes Auftauen und Einfrieren jedoch bewirkt einen Anstieg der sCD40L-Konzentration (63).

3.2.2 Messprinzip (Testprinzip)

Die Messung des sCD40L erfolgte mit einem von Roche Diagnostics entwickelten Reagenz auf einem Elecsys® 2010 Analyser. Das Reagenz Elecsys® sCD40L lot A-2

enthält zwei monoklonale Antikörper, die jeweils gegen unterschiedliche Epitope des sCD40L-Moleküls gerichtet sind.

Im ersten Schritt bilden ein biotinylierter monoklonaler Antikörper und ein mit einem Ruthenium-Chelat-Komplex markierter zweiter monoklonaler Antikörper einen Komplex nach dem Sandwich-Prinzip, da sie an zwei unterschiedlichen Strukturen des sCD40L-Moleküls binden können. Nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten, magnetisierbaren Mikropartikeln bindet sich der Komplex aus Molekül und Antikörpern über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung an die magnetisierbaren Mikropartikel.

Im nächsten Schritt wird das Reaktionsgemisch in der Messzelle durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert. Nicht fixierte markierte Antikörper werden mit Hilfe einer Pufferlösung entfernt. Nach Anlegen einer Spannung wird die durch eine Redoxreaktion entstehende Elektrochemilumineszenz des fixierten und mit dem Rutheniumkomplex markierten Analyten gemessen. Diese ist direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe(21).

Bei dem eingesetzten Reagenz handelte es sich um ein unmittelbar vor der Routineeinführung stehendes Forschungsreagenz.

3.2.3 Thrombozytenbestimmung

Da den Thrombozyten die entscheidende Rolle bei der Freisetzung des sCD40L zugeschrieben wird, wurde vor der Zentrifugation zusätzlich die Thrombozytenzahl jeder Probe ermittelt. Die Messung erfolgte mit einem Sysmex SE9000 Autoanalyser entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

Hierbei wird durch zwei mittels einer mikroskopisch kleinen Messöffnung verbundene Flüssigkeitsräume, von denen einer die verdünnte Blutprobe enthält, elektrischer Strom geleitet. Die hohe Verdichtung des elektrischen Feldes in dieser Messöffnung bewirkt beim Durchströmen einer Blutzelle eine Änderung des Widerstands zwischen den beiden Messelektroden, da die Zellen schlechte elektrische Leiter sind und sich somit von der Suspensionslösung in ihrer Leitfähigkeit unterscheiden. Diese Widerstandsänderung ist dabei proportional zum Volumen der Zellen. Somit kann neben der Zählung auch eine Zuordnung zu einer bestimmten Zellfraktion erfolgen (19).

3.3 Messung der sCD40L-Konzentration

3.3.1 Kalibration und Qualitätskontrolle

Neben dem Reagenz Elecsys® sCD40L lot A-2 wurden für die Messung 2 Kalibratoren sowie 2 Kontrollseren, jeweils in hohem und niedrigem Referenzbereich, benötigt. Um Kalibrator und Kontrollseren für die Messung zu erstellen, wurde das bei -4°C aufbewahrte lyophilisierte Material zunächst mit 1 ml destillierten Wassers aufgelöst, 30 min inkubiert, 2 min gemischt und anschließend zu je 330 µl aliquotiert. Wie die Proben wurden Kalibrator und Kontrollseren sofort bei -20°C eingefroren und erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut.

Durch Kalibratoren, die den zu messenden Analyten in einer genau definierten Konzentration enthalten, wird das Verhältnis von Konzentration und Mess-Signal festgelegt. Aus der Beziehung dieser beiden Größen zueinander wird eine Ausgleichsgerade bestimmt. Die Streuung der Kalibrationspunkte um diese Gerade ergibt die analytischen Grenzwerte, die eine Kalibration als erfolgreich oder nicht erfolgreich deklarieren.

Für den Gebrauch jedes neuen Elecsys® sCD40L lot A-2 RackPacks, welches Reagenz für 100 Messungen enthielt, sowie für sich länger als 5 Tage in Gebrauch befindende RackPacks war eine Kalibration durchzuführen.

In der anschließenden Qualitätskontrolle wurde die Kalibration mit 2 Kontrollen, die sCD40L in unterschiedlicher Konzentration enthalten, überprüft, um die adäquate Funktionsweise von Gerät und Reagenz zu überwachen.

Hierbei wird von der Messung eines Signals auf die Konzentrationen geschlossen, für die jeweils Bereiche definiert wurden. Für die „Kontrolle 2“ liegt dieser Bereich zwischen 0,57 und 1,07 ng/ml, der Zielwert ist 0,82 ng/ml. Die „Kontrolle 3“ hat einen Zielbereich von 4,00 bis 7,42 ng/ml, der Zielwert ist 5,71 ng/ml.

Vor jedem Messdurchgang wurden zunächst 2 bei -20°C eingefrorene Kalibratoren innerhalb von 20 min aufgetaut und durch 2-fache Wendung um 180° leicht gemischt. Anschließend wurde die Kalibration auf dem Elecsys® 2010 durchgeführt. War diese erfolgreich, so wurden die Kontrollseren in 20 min aufgetaut, im Vortex® gemischt und am Elecsys® 2010 gemessen.

3.3.2 Familiarisierung

Da es sich um die Erprobung einer neuen Methode handelt, war vor Beginn der eigentlichen Messung eine Familiarisierungsphase notwendig. Ziel einer Familiarisierung ist es, die adäquate Funktionsweise des Gerätes sicher zu stellen sowie den Anwender mit dem Gebrauch der Reagenzien und des Gerätes vertraut zu machen.

3.3.2.1 Erstellung der Plasmapools

Für die Durchführung der Familiarisierung wurden zwei EDTA-Plasmapools hergestellt; der erste mit einer sCD40L-Konzentration von unter 1 ng/ml, der zweite Pool mit einer Konzentration von über 3 ng/ml. Der Pool mit der niedrigen Konzentration ließ sich durch eine Blutentnahme bei einem gesunden Probanden gewinnen. Um den hohen sCD40L-Plasmapool von > 3 ng/ml zu erhalten, wurde ein Plasmagemisch aus 20 EDTA-Blutproben der täglichen Routine, die 5 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt worden waren, erstellt.

Entsprechend der Patientenproben wurden auch diese Blutproben mit 2750 x g bei 2-8°C 10 Minuten lang zentrifugiert und das Plasma anschließend abpipettiert. Von beiden Plasmapools wurden jeweils 21 Aliquots à 300µl sowie 6 Aliquots à 600 µl portioniert. Dieses Material wurde umgehend bei -20°C eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

3.3.2.2 Durchführung der Familiarisierung

Die Familiarisierung erfolgte in zwei Schritten. Während der ersten Phase, in der die Intra-Assay Präzision gemessen wurde, beinhaltete ein Durchgang jeweils alle 21 aliquotierten Proben der beiden Plasmapools zu je 300 µl. Die Aliquots wurden erst unmittelbar vor der Messung innerhalb von 20 min aufgetaut, kurz gemischt und anschließend im Elecsys® 2010 gemessen.

Die zweite Phase, in der die Inter-Assay Präzision der Methode bestimmt wurde, fand in insgesamt 5 Durchgängen statt. Pro Tag waren 1 bis 2 Durchgänge erlaubt; vor jeder dritten Messung war eine erneute Kalibration vorgeschrieben. Zu jeder Messung wurde je ein Aliquot zu 600 µl aus den beiden Plasmapools in einem Zeitraum von 20 min aufgetaut und gemischt. Anschließend wurden die beiden

Proben auf je 2 Aliquots zu jeweils 300µl aufgeteilt. So beinhaltete jeder Durchgang die Messung von 4 Proben.

3.3.3 Probenmessung

Lagen die Messergebnisse der Kontrollseren im definierten Zielbereich, so konnte mit der eigentlichen Messung der Proben begonnen werden. Durch vorherige Identifikation der den Proben zuzuordnenden Patienten und die Überprüfung ihrer Diagnosen konnte schon im Voraus eine Selektion und Einteilung der Patienten in die entsprechenden Gruppen erfolgen. Erfüllte der jeweilige Patient nicht die Einschlusskriterien, so wurde die zugehörige Probe verworfen.

Der Auftauvorgang benötigte wiederum 20 min. Im Anschluss wurden die Plasmaproben auf einem Vortex® kurz gemischt und bei 4000 U/min für 2 min ein zweites Mal zentrifugiert, um letzte korpuskuläre Anteile abzutrennen. Jeweils ein Volumen von 300 µl wurde je Probe in Hitachi-Cups aliquotiert und gemessen. Die sCD40L-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden ausgedruckt und anschließend in die Datenbank übertragen.

3.4 Statistische Methoden

Im Anschluss an die Messungen wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Hierfür wurde die Software SPSS® für Datenmanagement sowie zur statistischen und grafischen Analyse der Daten verwendet.

3.4.1 Mann-Whitney-Test

Zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt, ein nicht-parametrischer Test für unverbundene Stichproben eines quantitativen Merkmals beliebiger Verteilung. Teilt man die Ergebnisse in Gruppen ein, wie zum Beispiel nach Diagnose, Altersgruppe oder Geschlecht, so gelten diese als unverbunden.

Der Mann-Whitney-Test ist ein Verfahren in dem Ränge gebildet werden, aus welchen sich die Teststatistik U berechnet. Unterschreitet diese den so genannten kritischen Wert, so kann die Nullhypothese verworfen werden. Dies bedeutet, dass

man von einem Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen ausgehen kann. Eine statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ angenommen.

Ergibt die Variablenanzahl beider Gruppen zusammen einen Wert über 60, so wird Z durch die Normalverteilung approximiert. Überschreitet dieses Z nun den t-Wert, welcher 1,96 beträgt, so kann die Nullhypothese ebenso verworfen werden.

3.4.2 Korrelationsanalyse

Die mathematische Darstellung eines Zusammenhanges zweier Größen wird durch den Korrelationskoeffizienten r ausgedrückt. Ist $r = 1$, so wird von einem totalen Zusammenhang zwischen den beiden Größen ausgegangen.

Grafisch darstellen lässt sich diese Abhängigkeit durch eine Regressionsgerade. Diese zeigt durch ihre Steigung an, inwieweit ein Merkmal von einem anderen abhängt.

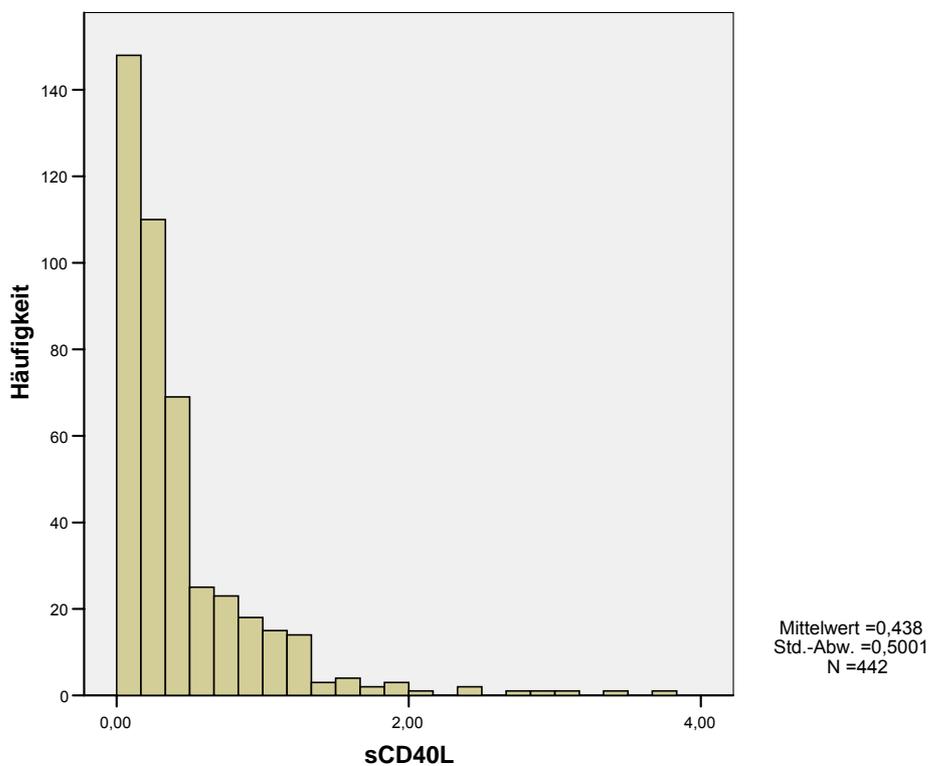
4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Datenanalyse

4.1.1 Gesamt

Grafik 1 zeigt die Verteilung der sCD40L-Konzentration aller untersuchten Patienten sowie der Referenzgruppe.

Grafik 1 – Gesamtüberblick der sCD40L-Konzentrationen

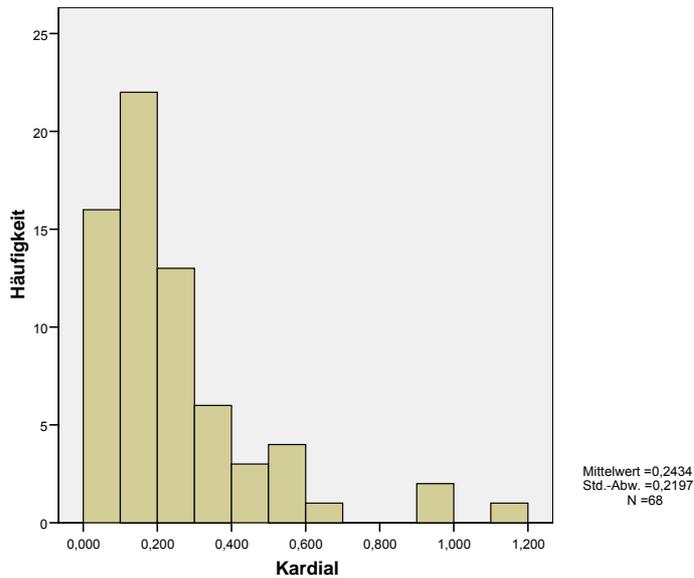


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,00 ng/ml bis 3,76 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,44 ng/ml, der Median 0,26 ng/ml und die 95. Perzentile 1,31 ng/ml.

4.1.2 Gruppe 1

In der Gruppe der Patienten mit einer kardiovaskulären, kardialen oder peripher vaskulären Erkrankung zeigt sich folgendes Ergebnis:

Grafik 2 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 1

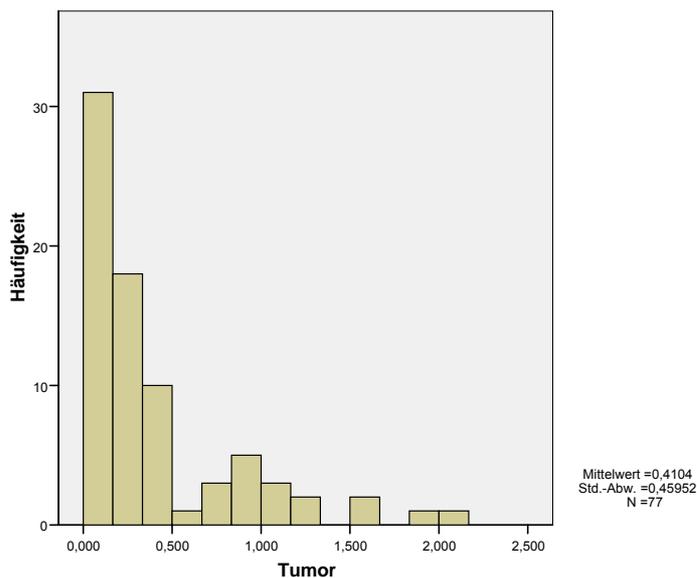


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,00 ng/ml bis 1,15 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,24 ng/ml, der Median 0,17 ng/ml und die 95. Perzentile 0,67 ng/ml.

4.1.3 Gruppe 2

Dies ist die Gruppe der malignen Erkrankungen; Grafik 3 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse:

Grafik 3 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 2

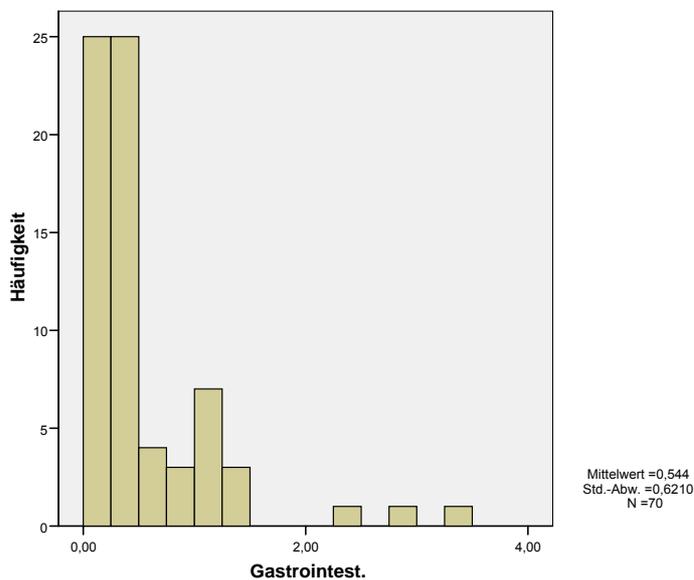


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,02 ng/ml bis 2,05 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,41 ng/ml, der Median 0,22 ng/ml und die 95. Perzentile 1,64 ng/ml.

4.1.4 Gruppe 3

In der Gruppe der benignen gastrointestinalen Erkrankungen liegt folgendes Ergebnis vor:

Grafik 4 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 3

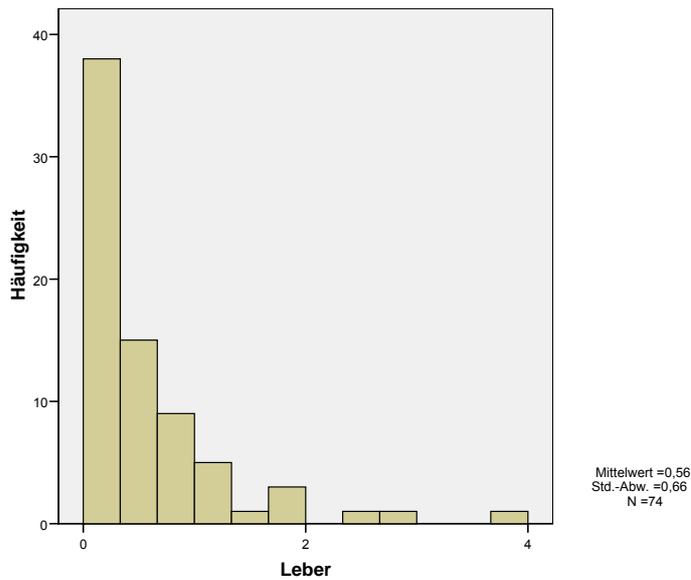


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,09 ng/ml bis 3,38 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,54 ng/ml, der Median 0,33 ng/ml und die 95. Perzentile 1,45 ng/ml.

4.1.5 Gruppe 4

Betrachtet man die Gruppe der benignen Lebererkrankungen, so finden sich folgende Ergebnisse:

Grafik 5 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 4

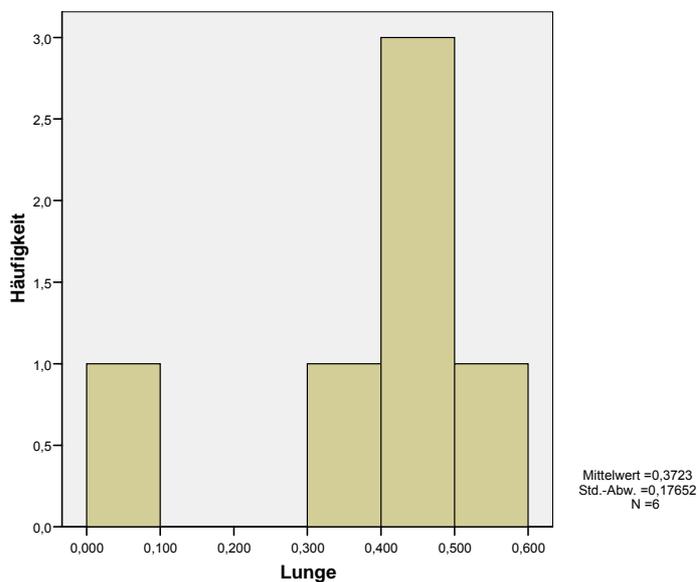


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,06 ng/ml bis 3,76 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,56 ng/ml, der Median 0,30 ng/ml und die 95. Perzentile 1,85 ng/ml.

4.1.6 Gruppe 5

Dies ist die Gruppe der benignen Lungenerkrankungen. Grafik 6 zeigt eine Übersicht über das Ergebnis:

Grafik 6 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 5

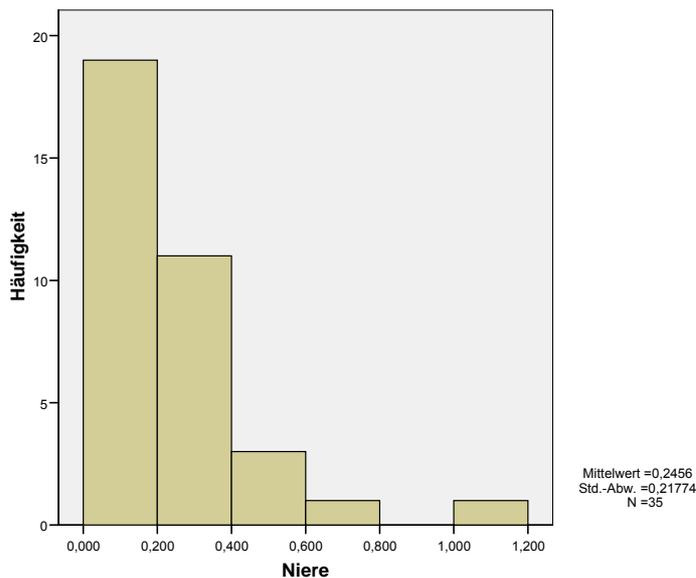


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,05 ng/ml bis 0,55 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,37 ng/ml, der Median 0,41 ng/ml und die 95. Perzentile 0,55 ng/ml.

4.1.7 Gruppe 6

In der Gruppe der benignen Nierenerkrankungen finden sich folgende Ergebnisse:

Grafik 7 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 6

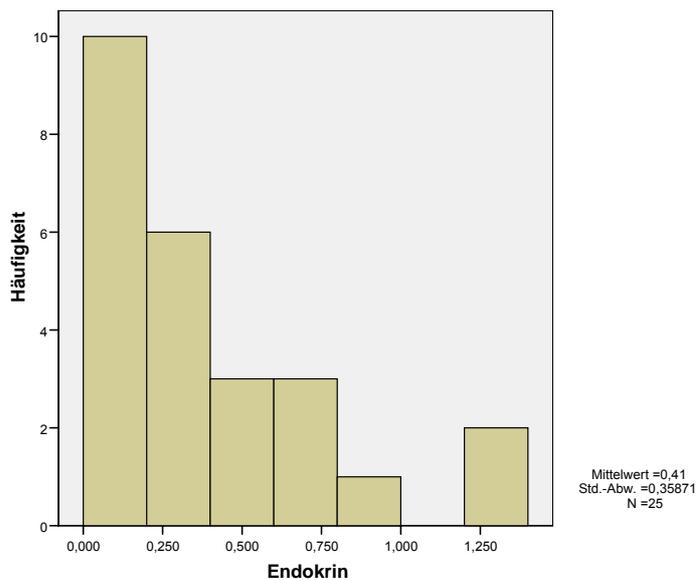


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,05 ng/ml bis 1,17 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,25 ng/ml, der Median 0,18 ng/ml und die 95. Perzentile 0,68 ng/ml.

4.1.8 Gruppe 7

Dies ist die Gruppe der endokrinen und metabolischen Erkrankungen, welche folgende Ergebnisse aufweist:

Grafik 8 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 7



Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,08 ng/ml bis 1,37 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,41 ng/ml, der Median 0,32 ng/ml und die 95. Perzentile 1,31 ng/ml.

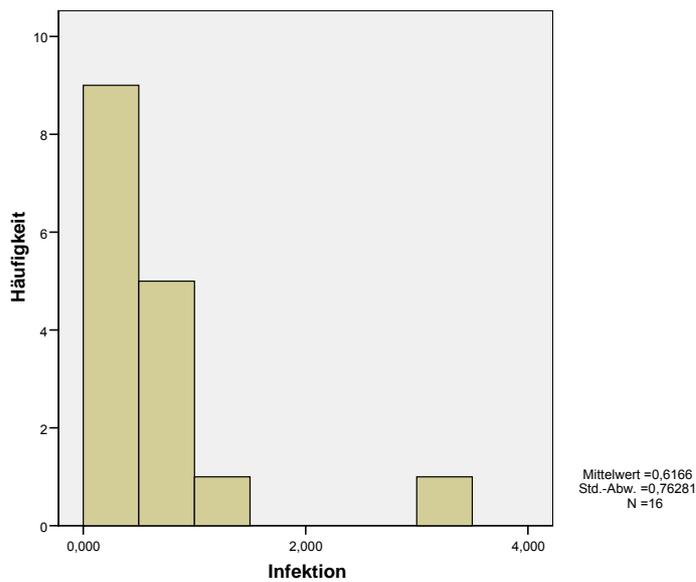
4.1.9 Gruppe 8

In der Gruppe der rheumatoiden Erkrankungen konnte nur ein Patient in die Studie aufgenommen werden. Die Messung dieser Probe ergab eine Konzentration von 0,16 ng/ml.

4.1.10 Gruppe 9

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Patienten mit akuten und chronischen Infektionen. Folgende Grafik gibt eine Übersicht der Ergebnisse wieder:

Grafik 9 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 9

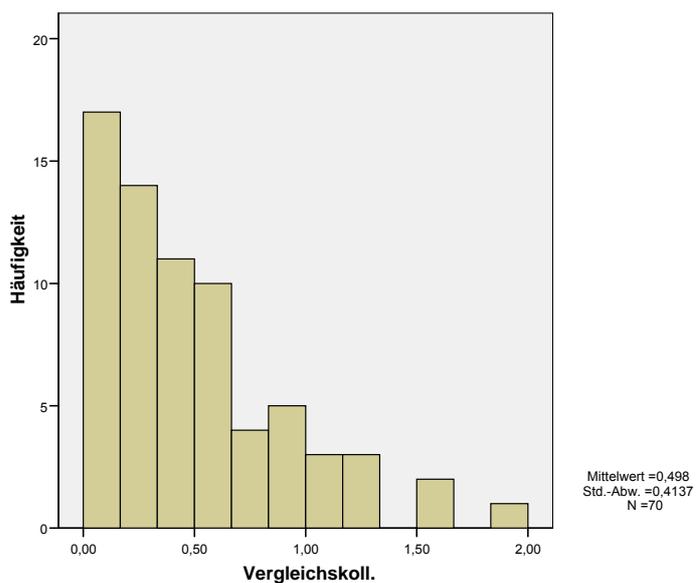


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,02 ng/ml bis 3,14 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,62 ng/ml, der Median 0,30 ng/ml und die 95. Perzentile 3,14 ng/ml.

4.1.11 Gruppe 10

Hierbei handelt es sich um das Vergleichskollektiv der gesunden Probanden. Grafik 10 gibt eine Übersicht über das Ergebnis:

Grafik 10 – sCD40L-Konzentrationen in Gruppe 10

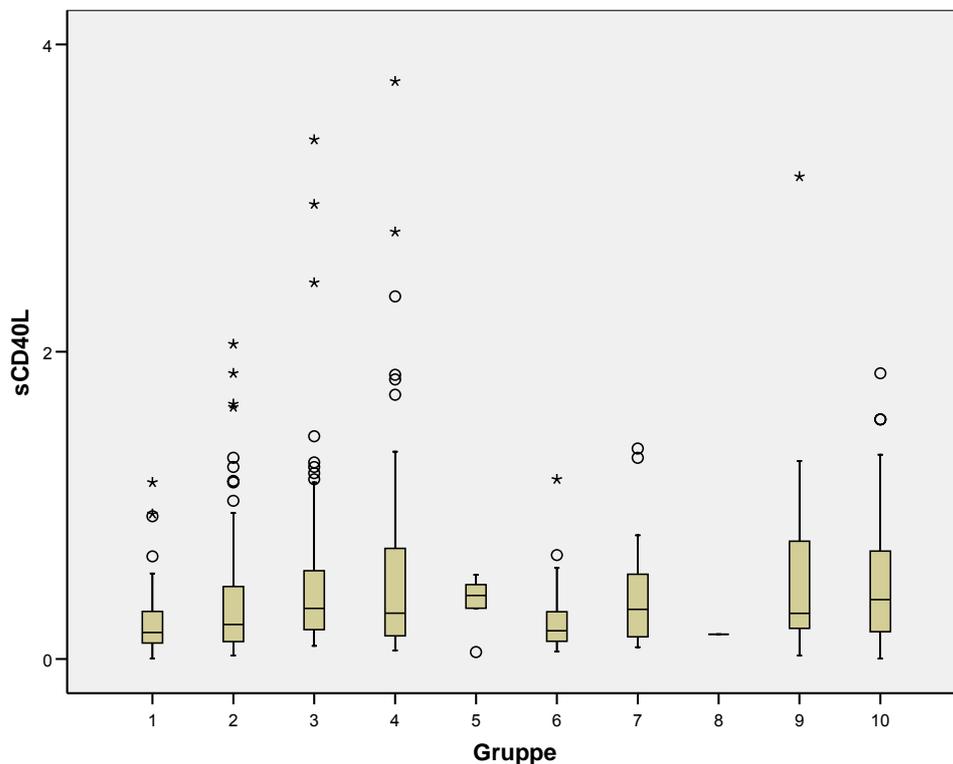


Die Spannweite der Werteverteilung reicht von 0,00 ng/ml bis 1,86 ng/ml, der Mittelwert beträgt 0,50 ng/ml, der Median 0,38 ng/ml und die 95. Perzentile 1,33 ng/ml.

4.1.12 Übersicht

Die folgende Boxplot-Darstellung veranschaulicht im direkten Vergleich die Wertelagen der einzelnen Gruppen. Die Markierung „○“ zeigt Ausreißer, also Fälle, die 1,5 bis 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind. Die Markierung „*“ stellt Extremfälle dar, deren Entfernung vom jeweiligen Rand über 3 Boxlängen beträgt. Wie in der Übersichtsdarstellung ersichtlich, werden die meisten abweichenden Werte in den Gruppen 2, 3 und 4 gefunden. Die weiteste Spannweite weisen die Gruppen 4 und 9 auf.

Grafik 11 – Boxplot-Darstellung der Ergebnisse aller Gruppen



4.2 Vergleich der Diagnosegruppen

Tabelle 3 zeigt den Vergleich aller 10 Gruppen mit dem Mann-Whitney-Test.

Die gelb unterlegten Felder markieren einen p-Wert $< 0,05$ und somit einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen diesen Gruppen. Folglich kann nur in 11 Fällen von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen werden. Dies gilt für den Vergleich der Gruppe 1 mit den Gruppen 3, 4, 7, 9 und 10, zwischen Gruppe 2 und den Gruppen 3 und 10 sowie zwischen Gruppe 6 und den Gruppen 3, 4, 9 und 10.

Tabelle 3 – Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,128	0,000	0,000	0,078	0,911	0,037	0,880	0,011	0,000
2			0,015	0,052	0,394	0,252	0,412	0,739	0,193	0,020
3				0,662	0,758	0,001	0,364	0,329	0,907	0,794
4					0,898	0,003	0,530	0,460	0,788	0,616
5						0,071	0,726	0,317	0,825	0,725
6							0,052	0,810	0,024	0,001
7								0,548	0,495	0,295
8									0,221	0,360
9										1,000

4.3 Vergleich der Geschlechter

Beim Vergleich der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht ergeben sich folgende Ergebnisse: Die Teststatistik Z mit einem Wert von $-0,927$ unterschreitet den kritischen Wert von $1,96$ und der p-Wert von $0,354$ liegt oberhalb $0,05$. Dies bedeutet, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Geschlechter besteht.

4.4 Vergleich der Altersgruppen

4.4.1 Deskriptive Datenanalyse

Des Weiteren wurden die Patienten in Altersgruppen, entsprechend des jeweiligen Lebensjahrzehntes, eingeteilt. In der folgenden Tabelle werden die sCD40L-Werte der jeweiligen Altersgruppen analysiert.

Tabelle 4 – Deskriptive Datenanalyse der Altersgruppen

		Alter								
		10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99
sCD40L	N	7	76	68	70	81	76	48	13	4
	Median	0,298	0,354	0,402	0,285	0,299	0,214	0,230	0,163	0,271
	Mittelwert	0,330	0,520	0,261	0,495	0,404	0,502	0,303	0,215	0,402
	Minimum	0,111	0,002	0,056	0,000	0,023	0,002	0,002	0,073	0,121
	Maximum	0,619	1,860	1,850	2,780	3,760	3,380	1,640	0,447	0,945

Am stärksten vertreten sind die Patienten zwischen 40 und 69 Jahren, diese Gruppen weisen auch die höchsten Maximalwerte auf. Der höchste Median findet sich im 4. Lebensjahrzehnt. Gleiches gilt auch für den höchsten Mittelwert, welcher im 3., sowie den kleinsten Minimalwert, der im 5. Lebensjahrzehnt anzufinden ist.

4.4.2 Vergleich der Altersgruppen

Der Vergleich der Altersgruppen zeigt die in der folgenden Tabelle dargestellten p-Werte:

Tabelle 5 – Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen

	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99
10-19	0,491	0,956	0,818	0,829	0,688	0,377	0,205	1,000
20-29		0,189	0,393	0,105	0,062	0,006	0,020	0,659
30-39			0,779	0,624	0,319	0,048	0,118	0,902
40-49				0,501	0,258	0,049	0,099	1,000
50-59					0,507	0,163	0,133	0,983
60-69						0,468	0,409	0,808
70-79							0,765	0,606
80-89								0,428

Es zeigt sich, dass sich nur die Altersgruppe von 70 bis 79 Jahren signifikant von den 20- bis 29-jährigen sowie den Gruppen des vierten und fünften Lebensjahrzehntes

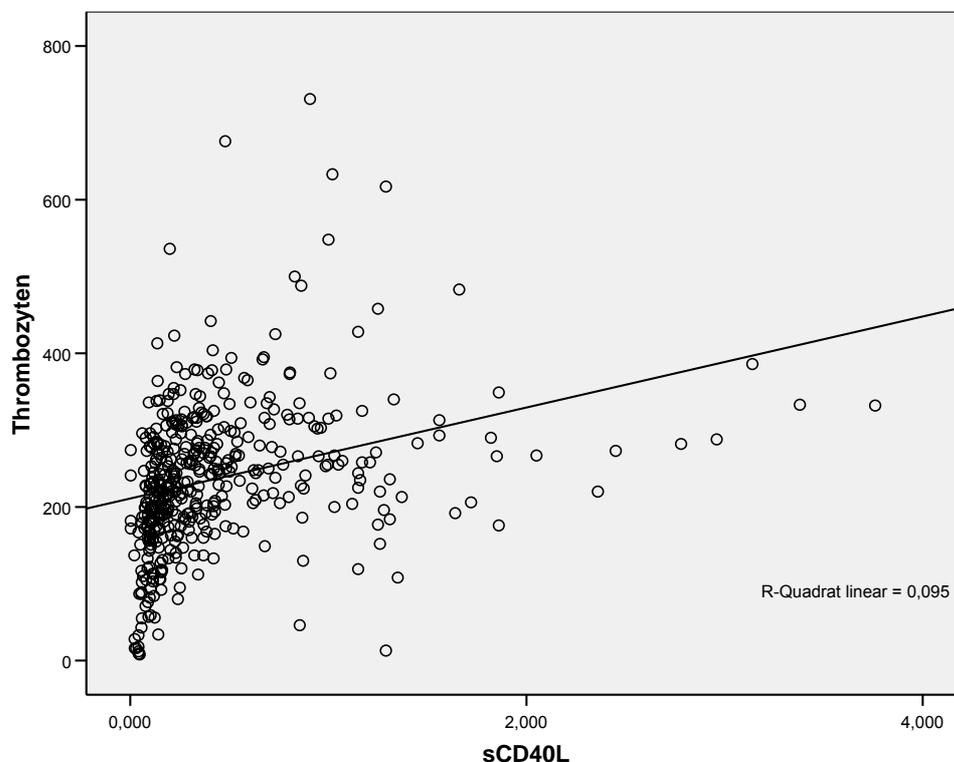
unterscheidet. Von den 20- bis 29-jährigen unterscheidet sich zusätzlich die des neunten Lebensjahrzehntes.

4.5 Vergleich mit der Thrombozytenzahl

Da den Thrombozyten die entscheidende Rolle bei der Freisetzung des sCD40L zugeschrieben wird, stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und der jeweiligen sCD40L-Konzentration besteht. Hat eine erhöhte Thrombozytenzahl einen erhöhten Gehalt an sCD40L im zugehörigen Blutplasma zur Folge?

Analysiert man diese Werte mittels Korrelationsanalyse, so ergibt sich eine Korrelation von $r = 0,308$ zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L Konzentration im Plasma. Somit besteht kein Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L Konzentration. Die Grafik 12 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L-Konzentrationen.

Grafik 12 – Korrelationsanalyse von Thrombozytenzahl und sCD40L-Konzentration



Der linearen Abhängigkeit der sCD40L-Konzentration von der Thrombozytenzahl liegt folgende Funktion zu Grunde:

$$f(x) = a + r x$$

Der Korrelationskoeffizient r , in diesem Fall 0,308, beschreibt das Ausmaß, mit dem sich die Werte des einen Merkmals auf die Werte des anderen Merkmals zurückführen lassen und der Wert a die fixe, mittlere Veränderung des einen Merkmals durch den Einfluss des anderen Merkmals (fixe Erhöhung der Thrombozyten). Das Bestimmtheitsmaß r^2 , in diesem Fall 9,5%, beschreibt den Anteil der Varianz einer Wertemenge, die durch das andere Merkmal erklärt werden kann.

5 Diskussion

5.1 Der sCD40 Ligand als Parameter für Herz-Kreislaufkrankungen

Ursprünglich wurde der CD40L auf T-Lymphozyten nachgewiesen und als ein Mediator des Immunsystems beschrieben (4, 25). Henn und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass der CD40L auch auf Thrombozyten exprimiert wird (28). Der Nachweis auf Zellen, die nicht zum Immunsystem sondern zur primären Hämostase zählen, entfachte einen Diskurs um die Rolle des CD40L in proinflammatorischen und prokoagulatorischen Prozessen (4).

Vor allem scheint der CD40L bzw. seine lösliche Form sCD40L auf Grund seines Vorkommens auf Thrombozyten und seiner proinflammatorischen und prokoagulatorischen Effekte zur Beurteilung eines akuten Koronarsyndroms interessant zu sein, da in der Pathophysiologie dieses Syndroms die Aktivierung der Thrombozyten und die damit verbundene Freisetzung von sCD40L eine entscheidende Rolle spielen (68). Der sCD40L fungiert somit nicht nur als Marker atherothrombotischer Komplikationen, sondern spielt wohl auch eine Rolle in deren Pathogenese und gilt als Bindeglied zwischen thrombotischen und inflammatorischen Phänomenen in der Atherogenese (2). Die Interaktion von sCD40L, der in gelöster Form zum größten Teil aus Thrombozyten stammt (4), mit seinem Rezeptor bewirkt in Endothelzellen und Leukozyten eine gesteigerte Expression proatherogener Faktoren wie zum Beispiel des TF (47). Besondere Beachtung aber gebührt seiner Rolle bei der Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen, für die man seine Funktion als Mediator inflammatorischer Prozesse als ursächlich ansieht. Vor allem MMP-9, eine Matrix-Metalloproteinase deren Freisetzung durch sCD40L getriggert wird, bewirkt einen Substanzverlust der betroffenen atherosklerotischen Plaque und in der Folge deren Ruptur, was als das pathophysiologische Korrelat eines akuten Koronarsyndroms gilt (59).

Der sCD40L wurde sowohl bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris als auch bei bislang symptomfreien Patienten vielfach untersucht (9, 27, 55). Demnach gelten inzwischen die Thrombozyten als die an atherosklerotischen Prozessen ursächlich direkt beteiligten Strukturen und der sCD40L als einer der

wichtigsten Mediatoren in der Entstehung atherosklerotischer Folgeerkrankungen (4). Er gilt somit als ein viel versprechender Marker in der Diagnostik eines akuten Koronarsyndroms und kardiovaskulärer Ereignisse im Allgemeinen. Zusätzlich ist wohl auch seine proinflammatorische Funktion von pathogenetischer Relevanz.

Neben kardiovaskulären Erkrankungen spielt dieser Biomarker durch sein fast ubiquitäres Vorkommen auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen, die eine inflammatorische Komponente aufweisen, eine Rolle. So konnte eine erhöhte Plasmakonzentration an sCD40L bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreises (14), bei malignen Tumoren (20) oder auch bei Stoffwechselerkrankungen nachgewiesen werden (53).

Es herrscht allerdings Unklarheit darüber, inwieweit diese Prozesse sich gegenseitig beeinflussen oder einander bedingen. Möglicherweise ist das Spektrum pathologischer Prozesse, in die der sCD40L involviert ist, umfassender als bisher angenommen.

5.2 sCD40L in diesen Untersuchungen

Ziel dieser Studie war es, in verschiedenen Patientenkollektiven mit definierten Krankheitsbildern sCD40L-Konzentrationen zu messen, um mehr über die klinische Relevanz bei verschiedenen Erkrankungen zu erfahren. Zum Vergleich wurde eine Referenzgruppe von gesunden Probanden herangezogen. Insbesondere interessierte dabei die Frage, bei welchen Erkrankungen mit einer Erhöhung zu rechnen sein wird und wie diese im Vergleich zu den anderen Erkrankungen und der Referenzgruppe liegen wird. Auch sollte etwaigen Hinweisen auf einen möglichen pathogenetischen Einfluss des sCD40L auf die jeweiligen Erkrankungen nachgegangen werden.

5.2.1 Ergebnisse der Referenzgruppe

Um die Ergebnisse der einzelnen Gruppen diskutieren zu können, soll zunächst auf das Vergleichskollektiv der Studie sowie den Referenzbereich des sCD40-Liganden eingegangen werden.

In der Gruppe 10 dieser Studie, den gesunden Probanden, lag der Median bei 0,38 ng/ml mit einer Spannweite von 0,00 bis 1,86 ng/ml. Die obere Grenze des 95%-

Konfidenzintervalle, das normalerweise zur Definition eines Referenzbereiches bei einseitigen Referenzbereichen herangezogen wird, lag bei 1,33 ng/ml.

In der Literatur ist bislang kein eindeutiger oberer Grenzwert für ein „Normalkollektiv“ definiert worden. So wird in einer Studie von Aukrust et al. bei einem Wert von 0,8 ng/ml von keiner deutlichen Erhöhung des Wertes ausgegangen (9). In einer Untersuchung von Lim et al. hingegen lagen in der Kontrollgruppe die sCD40L-Konzentrationen in einem Bereich von nur 0,01 bis 0,175 ng/ml (41).

Auf der anderen Seite liegt bei einer sCD40L-Konzentration von über 5 ng/ml das relative Risiko eines kardialen Ereignisses bei 3,00 (27).

So ist es schwierig, eine klare Grenze zu ziehen und Werte eindeutig zu definieren, doch lassen sich orientierend Werte bis 1 ng/ml als „niedrig“ und ab 3 ng/ml als „erhöht“ einschätzen. Auf Grund der nicht eindeutigen Datenlage zur oberen Referenzbereichsgrenze wurde für die weiteren Untersuchungen die selbst ermittelte Grenze von 1,33 ng/ml herangezogen.

5.2.2 Patienten mit Herz-Kreislauferkrankungen

5.2.2.1 Patientenkollektiv und Werte

Die aktuelle Studienlage erlaubt die Vermutung, dass insbesondere Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems über inflammatorische Prozesse zu einer Erhöhung des sCD40L führen. Doch abweichend von diesen Befunden wurde in dieser Studie für die Gruppe der Herz-Kreislauferkrankungen ein Medianwert von 0,17 ng/ml ermittelt, was allgemein als nicht erhöht gilt (2). Kein Patient der Patientengruppe mit Herz-Kreislauferkrankungen hatte einen sCD40L Wert oberhalb 1,33 ng/ml. Dieses Ergebnis scheint paradox, doch lassen sich hierfür möglicherweise Erklärungen finden.

Der Großteil der Patienten (siehe Tabelle 2) - insgesamt 49 von insgesamt 68 Patienten dieser Gruppe - hatte eine koronare Herzerkrankung; 17 unter ihnen mit einem Zustand nach AMI.

In aktuellen Studien wurden sCD40L-Plasmakonzentrationen vor allem bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und damit verbundener stabiler und instabiler Angina pectoris untersucht. Doch auch für Patienten mit einer arteriellen Hypertonie scheint

die Analyse dieses Biomarkers interessant zu sein, da sie als einer der entscheidenden Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose gilt (2) – das pathologische Korrelat für Gefäßerkrankungen wie zum Beispiel Carotisstenose oder koronare Herzerkrankung.

Wie bereits erwähnt, war bei keinem der Patienten dieser Studiengruppe eine Konzentration von $>1,33$ ng/ml nachweisbar; im Plasma der meisten Patienten fanden sich Werte im unteren Referenzbereich von $<0,5$ ng/ml.

5.2.2.2 Mögliche Ursachen für niedrige sCD40L-Konzentrationen

Auf der Suche nach Gründen für diese auffällig niedrigen Werte fielen bei der Durchsicht der Patientenakten die Medikationen der Studienteilnehmer auf. Der Großteil unter ihnen erhielt eine Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern. Neben ASS wurde meist auch der ADP-Antagonist Clopidogrel[®] verabreicht.

Diese Kombinationstherapie scheint einen additiven negativen Effekt auf die Plättchenaktivität zu haben, als deren Maß unter anderem die sCD40L-Konzentration gilt, und vermindert damit das Risiko für ein akutes Koronarsyndrom stärker als die alleinige Therapie mit ASS (65). Dennoch zeigt auch die alleinige Therapie mit ASS einen 50%igen Rückgang der sCD40L Freisetzung aus durch Kollagen stimulierten Thrombozyten. ASS verhindert die Bildung von Thromboxanen, die bei der Gerinnung als potenteste Mediatoren für die Aktivierung der Thrombozyten durch Kollagen aus der Gefäßwand gelten (46, 49). Die Behandlung mit Clopidogrel[®] allein bewirkt eine Hemmung der ADP-induzierten Aktivierung der Thrombozyten über eine irreversible Bindung an deren P2Y₁₂-Rezeptor (23) und hebt dadurch die Expression von CD40L vollständig auf (30).

Insgesamt erhielten nur 10 der Patienten in dieser Studiengruppe keinerlei antithrombozytäre Medikation, bei 12 der 68 Teilnehmer war die medikamentöse Therapie nicht zu eruieren.

Auch andere antithrombozytäre Medikamente scheinen einen Einfluss auf die Freisetzung des sCD40L zu haben. Der Biomarker vermag neben seinem Rezeptor CD40 auch an den gpIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten zu binden. Die Therapie mit Abciximab[®], einem Antikörper, der gegen diesen Rezeptor gerichtet ist, reduziert demnach dessen Wirkung auf Thrombozyten und hat eine Inhibition der Plättchenfunktion sowie eine signifikante Hemmung der weiteren sCD40L-

Expression zur Folge. Dadurch werden dessen prothrombotische und proinflammatorische Effekte bei der Destabilisierung von Thromben und der Aktivierung weiterer Plättchen verhindert (51). Die Thrombozytenaktivität wird zu 80% gehemmt (49) und das Risiko eines kardialen Ereignisses reduziert (60). Dies wurde zusätzlich in einer Studie an 1088 Patienten mit Koronarsyndromen (CAPTURE-Studie) gezeigt: Die Therapie mit Abciximab® schützt Patienten, die erhöhte sCD40L-Konzentrationen aufweisen, effektiv vor kardialen Ereignissen (27). Aber auch HMG-CoA-Reduktasehemmer, die bei der Behandlung der familiären Hypercholesterinämie als Therapie der Wahl gelten, scheinen neben ihrer Cholesterin-senkenden Wirkung auch eine anti-inflammatorische Wirkung zu entfalten. So konnte bei diesen Patienten unabhängig von der Cholesterin-senkenden Wirkung eine Reduktion des sCD40L um beinahe 40% nachgewiesen werden (56).

5.2.3 Patienten dieser Studie mit erhöhten Werten

Nur insgesamt 19 der in der Studie gemessenen Patienten, von denen vier nicht eindeutig einer Diagnosegruppe zugewiesen werden konnten, überschritten mit ihren Werten die Grenze von 1,33 ng/ml, welche in unserer Studie zur Definition des Referenzbereiches herangezogen wurde.

Den Wertebereich, bei dem in anderen Studien von einem signifikant erhöhten Spiegel des Biomoleküls ausgegangen werden kann - Werte oberhalb 5,00 ng/ml (2) – konnte in keinem Patientenplasma dieser Studie gefunden werden.

5.2.3.1 Vorliegende Erkrankungen

Die 19 Patienten mit erhöhten sCD40L Werten waren hauptsächlich den Gruppen der malignen, der benignen gastrointestinalen und der benignen hepatischen Erkrankungen zuzuordnen – neben den kardiovaskulären Erkrankungen und dem gesunden Vergleichskollektiv die prozentual am stärksten vertretenen Gruppierungen. Unter den 11 Patienten aus der Gruppe der benignen hepatischen Erkrankungen mit erhöhtem sCD40L Wert handelte es sich in neun Fällen um eine Hepatitis C. Fünf der neun Patienten mit einer benignen gastrointestinalen

Erkrankung und erhöhter sCD40L Plasmakonzentration hatten eine Refluxösophagitis.

Der maximale gemessene sCD40L Wert mit 3,76 ng/ml fand sich bei einem 53-jährigen Patienten mit Hepatitis C, gefolgt von 3,38 ng/ml bei einem 63-jährigen Patienten mit Colitis ulcerosa. Bei diesen Patienten, wie auch den weiteren Patienten mit einer erhöhten sCD40L-Konzentration, waren keinerlei Auffälligkeiten wie ein hohes Lebensalter oder eine erhöhte Thrombozytenzahl zu finden.

5.2.3.2 Mögliche Ursachen für vorliegende sCD40L-Konzentrationen

Warum keiner der Herz-Kreislauf-Patienten einen erhöhten sCD40L-Plasmaspiegel aufwies, lässt sich möglicherweise durch deren antithrombozytäre medikamentöse Therapie hinreichend erklären. Doch stellt sich die Frage nach den Ursachen für eine sCD40L-Erhöhung im Plasma der anderen Patientengruppen und hier vor allem der Patienten mit Hepatitis C und mit Refluxösophagitis.

Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einer Infektion durch bakterielle Erreger und erhöhten sCD40L-Konzentrationen. Bei der Meningokokken-Sepsis konnten erhöhte sCD40L-Spiegel nachgewiesen werden (31) und auch bei der Immunantwort von Endothelzellen und Plättchen im Rahmen einer Infektion mit *Rickettsia africae* scheint das Protein gemeinsam mit Toll-like Rezeptoren beteiligt zu sein (16). Zusätzlich fand man auch einen Anstieg der sCD40L-Konzentration bei der Inkubation von Plättchen mit Lipopolysacchariden (LPS) von *E.coli* (15). Die Beteiligung des sCD40L an immunologischen Prozessen bei der Abwehr diverser Infektionen scheint offensichtlich zu sein – doch inwieweit lässt sich diese Feststellung auf andere, auch virale Infektionen übertragen?

Bei immunologischen Untersuchungen von Patienten mit chronischer Hepatitis C finden Zylberberg et al. in einer 1999 veröffentlichten Studie deutlich erhöhte Spiegel an Tumornekrosefaktor, welcher mit der Schwere der Erkrankung korreliert (74). Auch erhöhte Spiegel von IL-6 scheinen mit Hepatitis C assoziiert zu sein (48). Lecombe et al. betrachten den erhöhten Spiegel an Tumornekrosefaktor sogar als Ursache für die Entstehung einer Insulinresistenz und die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes bei Hepatitis C Patienten (36). Auch bei der Refluxösophagitis finden Fitzgerald et al. in ihrer Untersuchung 3- bis 10-fach erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-8 und IFN- γ (22).

Der sCD40L hat ähnliche Wirkungen und Eigenschaften wie die hier diskutierten Zytokine. Strukturell gehört er zur Familie des Tumornekrosefaktors, weist in der Pathogenese der Arteriosklerose ähnliche pathophysiologische Effekte wie dieses Zytokin auf und induziert die Expression von Chemokinen, proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen und TF (5). Somit könnte hier ein Link bestehen zwischen den bei Infektionserkrankungen involvierten proinflammatorischen Zytokinen und einer Freisetzung von sCD40L.

Diese Zusammenhänge zeigen möglicherweise einen weiteren Aspekt des sCD40L auf und unterstreichen die Frage nach seiner Rolle im komplexen Entzündungsgeschehen chronischer Erkrankungen.

5.2.4 sCD40L-Konzentrationen im Gesamtkollektiv dieser Studie

Trotz der vereinzelt deutlich erhöhten sCD40L Konzentrationen bei einigen Patienten hatten die überwiegende Mehrheit der hier eingeschlossenen Patienten sehr niedrige sCD40L Werte. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu dem in der Literatur beschriebenen Nachweis einer Beteiligung des CD40-Systems an malignen (20) und neurodegenerativen (18) Erkrankungen sowie seiner Beteiligung an Immunprozessen (25). Zufrieden stellende Gründe für diese Ergebniskonstellation zu finden ist nicht einfach. Eine Möglichkeit könnte jedoch in der medikamentösen Therapie der Patienten liegen. Dabei sind neben der Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS primär eine Therapie mit Statinen, den wirksamsten Senkern eines erhöhten Cholesterinspiegels, als ursächlich zu erwägen. Da dies ein Zustand ist, der große Teile der Bevölkerung betrifft, beispielsweise 66% einer Studienpopulation in Bangkok (35), ist auch die Medikation mit diesem Arzneimittel sehr häufig. Neben ihrer cholesterin-hemmenden Wirkung unterdrücken Statine zusätzlich auch die Freisetzung des sCD40L (56) und haben somit eine antiinflammatorische Wirkung. Dies ist möglicherweise eine der Ursachen für die gemessenen niedrigen sCD40L Konzentrationen bei vielen Probanden dieser Studie. Alle in diese Studie eingeschlossenen Probanden entstammten einem Kollektiv von stationären Krankenhauspatienten, dessen medikamentöse Therapie sich sicherlich nicht von anderen Krankenhauskollektiven unterschied. Somit dürfte die Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern und Statinen auch innerhalb dieser Studienpopulation verbreitet gewesen sein. Auch wenn dazu keine Daten

generiert wurden, muss von dieser Tatsache ausgegangen werden sodass sich die niedrigen sCD40L Messergebnisse sicherlich zum großen Teil auf diese Art der Medikation zurückführen lassen.

5.3 Unterschiede zwischen einzelnen Studiengruppierungen

5.3.1 Vergleich der Diagnosegruppen

Der Vergleich der einzelnen Gruppen zeigte keine eindeutigen Unterschiede im Mann-Whitney-Test. Allerdings zeigte sich vor allem bei den Patienten der Gruppe 1 mit kardiovaskulären Erkrankungen häufig ein signifikanter Unterschied zu anderen Gruppen (siehe Tabelle 3 auf Seite 31). Gleichwohl fielen die Messwerte der Gruppe 1 insgesamt niedriger aus, wofür sicherlich die „Standard-Medikation“ mit Thrombozytenaggregationshemmern bei den zugehörigen Patienten verantwortlich war. Auffällig ist auch, dass im Vergleichskollektiv häufig höhere Werte im Vergleich zu den anderen Patientengruppen vorkamen. Eine Ursache ist schwer nachzuvollziehen. So scheidet vor allem auch eine präanalytische Komponente bei dieser Gruppe aus, da die Probennahme am ehesten standardisiert und die Zeit von der Probennahme bis zur Separierung des Plasmas am kürzesten war.

5.3.2 Vergleich der Geschlechter und der Altersgruppen

Auch konnte kein Unterschied zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden, ebenso verhielt es sich mit den verschiedenen Altersstufen. Lediglich Studienteilnehmer im Alter von 70 bis 79 Jahren wiesen Konzentrationen auf, die sich deutlich von den Werten der Teilnehmer im fünften, vierten und dritten Lebensjahrzehnt unterschieden; letztere Gruppe war zusätzlich signifikant verschieden von den Probanden von 80 bis 89 Jahren. Auf Grund der geringen Fallzahl kann dieser Unterschied jedoch auch zufällig sein. Zu beachten gilt zudem, dass das gesunde Vergleichskollektiv - die Gruppe mit den höchsten Konzentrationen an sCD40L - fast ausschließlich Personen zwischen 20 und 29 Jahren beinhaltete. Somit lieferte die beinahe jüngste Altersgruppe signifikant höhere Spiegel des Biomarkers als weitaus ältere Probandengruppen. Dennoch wäre es falsch, junges Alter und eine erhöhte Freisetzung von sCD40L in Verbindung zu bringen. Auch hier lässt sich als potenzieller Grund für diesen signifikanten

Unterschied mit höheren Werten in der Kontrollgruppe die antithrombozytäre Therapie und cholesterinsenkende Therapie mit Statinen bei den älteren Patienten anführen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Dallas Heart Study; es wurde keinerlei Assoziation zwischen den einzelnen sCD40L-Quartilen und den Parametern Alter und Geschlecht gefunden. Der Altersmedian der Patienten mit Konzentrationen von über 2,48 ng/ml sCD40L entsprach dem der Patienten anderer Quartilen mit niedrigeren sCD40L-Spiegeln. Ähnlich verhielt es sich mit dem Geschlecht; der Anteil der männlichen Studienteilnehmer war in allen Quartilen annähernd gleich (17).

5.3.3 Vergleich mit der Thrombozytenzahl

Bei der Messung der sCD40L-Konzentration wurde auch die Thrombozytenzahl bei jedem Patienten bestimmt. Möglicherweise besteht grundsätzlich eine direkte Beziehung zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L Konzentration. Allerdings konnte in dieser Untersuchung mit einer Korrelation von $r = 0,325$ keinerlei Zusammenhang zwischen den beiden Messparametern nachgewiesen werden.

Entscheidend für eine Freisetzung von sCD40L scheint demnach nicht die Gesamtanzahl der Thrombozyten zu sein, sondern in welchem Maße diese aktiviert sind. In einer groß angelegten Studie mit ACS-Patienten wurde eine Subgruppe von 106 Patienten mit akutem Brustschmerz auf sCD40L-Spiegel und Thrombozytenaktivierung untersucht. Als Maß wurde hierfür der prozentuale Anteil der Monozyten, die sich in den Plättchenaggregaten befanden, verwendet. Bezogen auf die sCD40L-Konzentration ergab sich ein klarer Zusammenhang. Mit steigender Plättchenaktivierung stieg auch der Spiegel des Biomoleküls (27). Ähnliches ergaben auch Untersuchungen an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Anhaltend erhöhte sCD40L-Spiegel sprechen möglicherweise für eine beständige Aktivierung der Thrombozyten (61).

In einer anderen Studie, die gesunde Probanden neben Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und reaktiver Thrombozytämie sowie Patienten mit essentieller Thrombozytämie untersuchte, fand sich jedoch eine enge Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L-Spiegel. Doch auch hier folgerten die Autoren, dass dieses Biomolekül während der Aktivierung der Plättchen in vivo frei gesetzt werde

und es zudem in Zusammenhang mit deren Regeneration, die bei den Erkrankungen dieser Studie eine entscheidende Rolle spielt, stehe (66).

5.4 Problematik des sCD40L

Nach seiner Erstbeschreibung erschien sCD40L als ein sehr viel versprechender neuer Parameter, der eine wichtige Rolle als Mediator im Immunsystem spielt (4, 25, 72). Zudem konnte seine Freisetzung bei der Thrombozytenaktivierung und seine Funktion in der Pathogenese der Arteriosklerose nachgewiesen werden (9, 60). Schon bald sah man ihn als einen Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und hoffte, mit Hilfe des sCD40L das Kurzzeitrisko für ein kardiales Ereignis besser abschätzen zu können (68).

5.4.1 Schwierigkeiten bei der Bestimmung des sCD40L

Wie bei jedem klinisch-chemischen Marker ist eine standardisierte Messmethode essentiell für dessen Etablierung und die Entwicklung seiner klinischen Bedeutsamkeit. Dies gilt auch für die präanalytische Phase. So führte in einer Studie von Varo et al. die Verwendung unterschiedlicher Probenmaterialien zu kontroversen Ergebnissen: In Serum konnten weitaus höhere Konzentrationen an sCD40L als in Plasma, welches durch Hemmung der Blutgerinnung gewonnen wird, nachgewiesen werden. Auch wiederholtes Einfrieren und Auftauen führte zu einem signifikanten Anstieg des Analyten in der Probe. Zudem hat die Zentrifugation einen Einfluss. So trennt eine höhere Zentrifugationsstärke das Plasma gründlicher von den Thrombozyten, sodass dadurch ein plättchenärmeres Plasma gewonnen werden kann und eine geringere Menge an sCD40L nachweisbar ist (64). Ist die Zentrifugation insgesamt zu schwach, so weist die unzureichend gereinigte Plasmaprobe schon allein dadurch einen höheren sCD40L-Wert auf (29).

Des Weiteren zeigte sich eine Beeinflussung des Messergebnisses durch Plasmabestandteile wie Cholesterin oder Bilirubin (64). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine vergleichende Studie an Patienten mit ACS und einer gesunden Vergleichsgruppe: bei der Untersuchung der Plasmaproben fand sich ein Unterschied bezüglich der vorliegenden sCD40L-Konzentration, welcher sich hingegen in den entsprechenden Serumproben nicht nachweisen ließ. Auch diese

Autoren folgern, dass ausschließlich Plasmaproben für die Bestimmung des Biomoleküls sinnvoll seien und die präanalytische Vorgehensweise entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis habe (70). Ivandic und seine Kollegen zweifeln sogar die Aussagekraft aller bisher beschriebenen, erhöhten sCD40L-Werte an, da diese das Ergebnis einer in vitro stattfindenden Thrombozytenaktivierung sein könnten. Demnach sei auch eine Erklärung für die weitaus höheren Serum- als Plasmakonzentrationen an sCD40L gefunden, da er, den Autoren zu folgern, hauptsächlich bei der Blutgerinnung aus den Thrombozyten frei gesetzt werde (32). Belässt man zudem Serumproben nach der Blutentnahme einige Zeit bei Raumtemperatur, so kommt es ex vivo nachweislich zu einer vermehrten Freisetzung von sCD40L. Eine Standardisierung dieser Prozedur ist jedoch im klinischen Alltag äußerst schwierig. Für Halldorsdottir et al. birgt der Messvorgang an sich aber noch weit mehr Fehlerquellen (26). So kommen unterschiedliche Messmethoden zu verschiedenen Ergebnissen. Teilweise liegt das an der Anwendung von Serum- und Plasmaproben mit der jeweils nicht für die entsprechende Probenform vorgesehenen Untersuchungsmethoden. Vergleicht man die Ergebnisse dieser beiden Probenformen, so zeigen sie kaum eine Korrelation (26). Des Weiteren liegt das gesuchte Protein im Plasma oft in so geringer Konzentration vor, dass die eingesetzte Messmethode zum Nachweis häufig zu unempfindlich ist (26, 29). Da in vielen Studien keine genauen Angaben zum Prozedere und präanalytischen Vorgehen gemacht werden, sind deren Ergebnisse insgesamt kritisch zu betrachten (26, 32).

5.4.2 Rolle und Funktion des sCD40L

Seit seiner Erstbeschreibung war und ist der sCD40L Gegenstand der Forschung und zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. Die anfangs so viel versprechenden Ergebnisse und Hoffnungen auf einen Einsatz in der klinischen Diagnostik beginnen nun, gestützt durch neuere experimentelle und klinische Forschungsarbeiten, kritisch hinterfragt zu werden. Dementsprechend konnten die Ergebnisse der ersten Studien häufig nicht bestätigt werden.

So fanden Sonmez et al. bei einer Gruppe junger Männer mit Hypertonie keine erhöhten sCD40L-Werte (57) – im Gegensatz zur Untersuchung von Yan et al., die eine verstärkte Expression des CD40-Systems bei Bluthochdruck nachweisen

konnten (71). Laut ersterer Studie könne sich bei der noch nicht allzu lang bestehenden Hypertonie junger Männer noch kein inflammatorischer Status eingestellt haben, was als Grund für die fehlende Reaktion des CD40-Systems und die somit niedrigen sCD40L-Konzentrationen gesehen wird (57). Gleichmaßen kann man erhöhte sCD40L-Konzentrationen bei Patienten mit Hypertonie wie von Yan et al. in ihrer Studie aber auch als erwartungsgemäßes Messergebnis interpretieren.

Des Weiteren wird die Hypothese, dass der sCD40L als Risikofaktor und Marker einer kardiovaskulären Erkrankungen gelte (2, 6), in Frage gestellt. Liang et al. schreiben dem sCD40L im Gegensatz zu konventionellen Risikofaktoren keine signifikante Rolle bei der Vorhersage der koronaren Herzkrankheit zu (40). Zudem wird dem sCD40L in der Dallas Heart Study kein Nutzen für das Screening subklinischer Arteriosklerose bei Personen mit geringem kardiovaskulärem Risiko zugeschrieben (17).

In der Studie von Henn et al. wird ein anderer Aspekt der sCD40L-Funktion bei inflammatorischen Prozessen dargestellt. In Experimenten mit natürlichem sCD40L zeigte sich eine Instabilität des löslichen Proteins. Mit dem Übergang des von Thrombozyten freigesetzten Moleküls in seine gelöste Form gerät es demnach in einen relativ instabilen Zustand und ist dadurch biologisch inaktiv. Zwar interagiert das Protein kurz nach seiner Freisetzung mit Endothelzellen und Monozyten, wodurch eine inflammatorische Antwort getriggert wird. Dieser Effekt ist jedoch nur von kurzer Dauer - eine überschießende Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe wird verhindert und das inflammatorische Potential des sCD40L damit strikt begrenzt (29). Auch die Studiengruppe um Chen konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass lediglich der membrangebundene CD40-Ligand auf CD4 positiven T-Lymphozyten im Stande ist, eine proinflammatorische Reaktion in den Effektorzellen hervorzurufen (13). Der aus Thrombozyten frei gesetzte sCD40L hätte demnach eine andere Aufgabe als bisher angenommen. Seine selbstlimitierende Funktionsweise verhält sich für Henn und Kollegen wie eine Art Schutzmechanismus vor einer massiven Immunreaktion, wodurch deren ungünstige Folgen im umliegenden Gewebe verhindert werden. Zudem findet sich diese Instabilität nur bei Versuchen mit dem natürlichen Protein, wohingegen rekombinanter sCD40L in seiner stabilisierten Form -wie er üblicherweise in Studien verwendet wird- nicht die instabilen, selbstlimitierenden Eigenschaften seiner Funktion in vivo wiedergibt. So wird auch in

dieser Studie die Kritik der Autoren an nicht eindeutig dokumentierter Vorgehensweise in Experimenten deutlich. Sie geben zudem an, dass sie in einer Untersuchung von Plasmaproben einer Patientengruppe mit Lupus erythematodes sowie bei Patienten nach PTCA keine sCD40L-Erhöhung nachweisen konnten, was für Henn et al. erneut für ein nicht exakt definiertes experimentelles Vorgehen spricht (29). Bei den Untersuchungen der anderen Autoren wurde möglicherweise das verwendete Plasma ungenügend von Thrombozyten getrennt. Durch ihre Funktion als „sCD40L-Reservoir“ ex vivo können demzufolge die Plättchen für die erhöhten Konzentrationen des Markers in diesen Studien verantwortlich gemacht werden (29).

5.5 sCD40L und andere Biomarker bei akutem Koronarsyndrom

Der sCD40L gilt als einer der neuen, viel versprechenden Biomarker zur Diagnostik und Risikostratifizierung bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom. Hierfür gibt es die meisten Untersuchungen. Welche Rolle der Marker jedoch bei anderen klinischen Fragestellungen spielt, ist noch wenig erforscht. Unumstritten ist seine immunmodulatorische Wirkung, doch inwieweit dies in der Diagnostik genutzt werden kann, ist bisher unzureichend geklärt.

Auch in dieser Studie konnte dies nicht beantwortet werden. Es konnten keinerlei auffällige sCD40L Konzentrationen, die einer bestimmten Erkrankung zugeordnet werden können, nachgewiesen werden. Hierfür gibt es wohl mehrere Gründe. Neben antithrombozytärer Medikation, vor allem in der Gruppe der Herz-Kreislauf-Patienten, spielen möglicherweise auch die nicht exakte Standardisierung der präanalytischen wie auch analytischen Phase eine nicht zu vernachlässigende Rolle, was auch ein häufiger Kritikpunkt in den bisher zu diesem Thema veröffentlichten Studien ist. Ebenso mehren sich die Stimmen, die erhebliche Zweifel an den nach ersten Studien erwarteten anfangs so bahnbrechenden Entdeckungen über Rolle und Funktion des sCD40L äußern. Zudem ist der Enthusiasmus über die zunächst vermutete Aussagekraft des sCD40L als Risikomarker bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung einer differenzierteren und kritischeren Betrachtungsweise gewichen.

Dieser Biomarker ist nicht die einzige Möglichkeit, ein frühes Stadium eines akuten Koronarsyndroms zu diagnostizieren. Die Entzündungsreaktion gilt nach dem heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand als erwiesene Komponente der

Pathogenese der Arteriosklerose und zeigt sich in einer variablen Erhöhung zirkulierender Faktoren (2). Auch an dem Geschehen einer Plaqueruptur sind eine Reihe entzündlicher Mechanismen beteiligt (7). So wird in der Studie von Zhou et al. den Biomolekülen MMP-8, PAPP-A, ox-LDL und Antikörpern gegen ox-LDL ein vergleichbarer prognostischer Wert wie dem sCD40L zugeschrieben (73); gleiches gilt für IL-6 und ox-LDL, die Ergebnisse der Arbeit von Lobbes et al. (42).

Sämtliche Faktoren sind auf ihre Weise mit einer gewissen Entzündungsreaktion an der Gefäßwand verbunden, doch hat in der Diagnostik eines ACS jeder Biomarker seinen individuellen Stellenwert – sei es in der Diagnostik eines akuten Stadiums der Erkrankung, der Risikoabschätzung für den weiteren Verlauf oder als Hilfe bei der Entscheidungsfindung bezüglich der Therapieoptionen. Hierbei wurde dem sCD40L das Potential zugeschrieben, bei Konzentrationsanstiegen ein akutes Risiko in Form eines plötzlichen kardialen Ereignisses sowie einen potentiellen therapeutischen Nutzen durch eine Medikation mit gpIIb/IIIa-Antagonisten anzuzeigen (8).

Doch wie gezeigt werden konnte, kann dieser Marker momentan noch nicht die von ihm erhofften Erwartungen erfüllen. Zu unklar ist sein komplexes Wirkungsspektrum im inflammatorischen Geschehen. Auch ist es momentan schwer, eine verlässliche Aussage über die Wertigkeit einer gemessenen Plasmakonzentration zu treffen geschweige denn diese zu bewerten, da die präanalytischen Probleme derzeit noch nicht gelöst sind und somit auch keine Referenzbereiche definiert werden konnten. So ist der sCD40-Ligand noch weit davon entfernt, zu einem standardisierten Parameter in der diagnostischen Praxis zu werden. Bis heute sind noch viele Fragen offen und es werden noch einige Studien nötig sein um die Rolle des sCD40L in der Pathogenese der Arteriosklerose sowie seine immunologische Funktion genauer zu klären. Dies gilt auch für die Hoffnung, aufbauend auf diesen Erkenntnissen neue therapeutische Möglichkeiten gezielt zu verfolgen.

6 Zusammenfassung

Der sCD40L ist ein Transmembranprotein und gehört strukturell zur Familie der Tumornekrosefaktoren. Ursprünglich identifiziert als essentieller Bestandteil bestimmter Immunfunktionen, wurde nun auch seine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und der Entstehung von Plaqueinstabilitäten nachgewiesen. Größtenteils von Thrombozyten exprimiert, geht er bei deren Aktivierung in eine lösliche Form über und übt proinflammatorische Funktionen, wie die Ausbildung von Thrombozyten-Monozytenaggregaten sowie die Generierung eines entzündlichen, prokoagulatorischen Milieus, aus. Neben der Aktivierung weiterer Thrombozyten konnte dem sCD40L auch ein destabilisierender Effekt auf bestehende Thromben nachgewiesen werden. Große Hoffnung liegt demnach in seiner Potenz als Marker eines akuten Koronarsyndroms. Doch auch bei malignen, metabolischen, neurodegenerativen sowie autoimmunologischen Erkrankungen fanden sich erhöhte Konzentrationen an sCD40L.

Ziel dieser Studie soll sein, die Beteiligung dieses Biomarkers bei verschiedenen Krankheiten weiter zu ergründen sowie der Frage nach einem potenziellen klinischen Nutzen und validen Referenzbereichen nachzugehen.

443 Patienten wurden in die Studie aufgenommen und in 10 Diagnosegruppen eingeteilt: Gruppe 1 kardiovaskuläre und kardiale, Gruppe 2 maligne, Gruppe 3 benigne gastrointestinale, Gruppe 4 benigne hepatische, Gruppe 5 benigne pulmonale, Gruppe 6 benigne renale, Gruppe 7 metabolische und endokrine Erkrankungen, Gruppe 8 Krankheiten des rheumatischen Formenkreises, Gruppe 9 Patienten mit akuten und chronischen Infektionen sowie ein gesundes Vergleichskollektiv in Gruppe 10. Die sCD40L Konzentration wurde in allen EDTA-Plasmaproben auf einem Elecsys[®] Analyser 2010 mit dem von Roche Diagnostics entwickelten Elecsys[®] sCD40L lot A-2 gemessen.

Der mediane sCD40L Wert ergab 0,17 ng/ml in Gruppe 1, 0,22 ng/ml in Gruppe 2, 0,33 ng/ml in Gruppe 3, 0,30 ng/ml in Gruppe 4, 0,41 ng/ml in Gruppe 5, 0,18 ng/ml in Gruppe 6, 0,32 ng/ml in Gruppe 7, 0,16 ng/ml in Gruppe 8 und 0,30 ng/ml in Gruppe 9. Beim Vergleichskollektiv ergab sich eine Konzentration von 0,38 ng/ml. Verglichen mit den gesunden Studienteilnehmern in Gruppe 10 waren nur die Werte der Gruppen 1, 2 und 6 signifikant erniedrigt. Es ließ sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und sCD40L nachweisen.

Insgesamt ist der sCD40L bei Patienten mit schweren Krankheiten im Gegensatz zu gesunden Personen nicht erhöht. Vor allem bei der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen mag dies an der größtenteils verabreichten antithrombozytären Medikation liegen. Zudem verbergen sich Probleme im präanalytischen Vorgehen, da jedwede Aktivierung der Thrombozyten ex vivo zu einer Erhöhung der nachweisbaren Konzentration an sCD40L führt, was wiederum eine deutliche Einschränkung der klinischen Aussagefähigkeit eines erhöhten Messwertes zur Folge hat. Auch sind viele Fragen bezüglich der Funktion und des Vorkommens dieses Biomarkers noch ungeklärt, sodass eine standardisierte Einführung dieses Markers im Rahmen der Risikoabschätzung bei Patienten mit einem ACS kritisch zu sehen ist.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Akinci G, Coskun S, Akinci B, Hekimsoy Z, Bayindir P, Onur E, Ozmen B. Atherosclerosis risk factors in children of parents with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007; 194: e165-171.
- 2) Alber HF, Suessenbacher A, Weidinger F. Die Rolle der Inflammation in der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117: 445-455.
- 3) Allanore Y, Borderie D, Meune C, Lemarechal H, Weber S, Ekindjian OG, Kahan A. Increased plasma soluble CD40 ligand concentrations in systemic sclerosis and association with pulmonary arterial hypertension and digital ulcers. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 481-483.
- 4) Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-Derived CD40L. *Circulation* 2002; 106: 896-899.
- 5) Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. Cd40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247-252.
- 6) Apple FS, Wu AH, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, Pagani F, Christenson RH, Mockel M, Danne O, Jaffe AS. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2005; 51: 810-824.
- 7) Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes. Part I: Introduction and Cytokines. *Circulation* 2006; 113: e72-e75.
- 8) Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes. Part IV: Matrix Metalloproteinases and Biomarkers of Platelet Activation. *Circulation* 2006; 113: e382-e385.
- 9) Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999; 100 (6): 614-620.
- 10) Aukrust P, Waehre T, Damas JK, Gullestad L, Solum NO. Inflammatory role of platelets in acute coronary syndromes. *Heart* 2001; 86: 1047-1054.
- 11) Aytekin V. Update on ACC/ESC criteria for acute ST-elevation myocardial infarction. *Anadolu Kardiyol Derg* 2007 Jul;7 Suppl 1: 14-15.
- 12) Balla J, Magyar MT, Bereczki D, Valikovics A, Nagy E, Barna E, Pal A, Balla G, Csiba L, Blasko G. Serum levels of platelet released CD40 ligand are increased in early onset occlusive carotid artery disease. *Dis Markers* 2006; 22: 133-140.

- 13) Chen Y, Chen J, Xiong Y, Da Q, Xu Y, Jiang X, Tang H. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 106-117.
- 14) Ciferska H, Horak P, Hermanova Z, Ordeltova M, Zadrazil J, Tichy T, Scudla V. The levels of sCD30 and of sCD40L in a group of patients with systemic lupus erythematoses and their diagnostic value. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 723-728.
- 15) Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, Acquart S, Garraud O. Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. *Intensive Care Med* 2007; 33: 382-384.
- 16) Damas JK, Jensenius M, Ueland T, Otterdal K, Yndestad A, Froland SS, Rolain JM, Myrvang B, Raoult D, Aukrust P. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* 2006; 177: 2699-2706.
- 17) De Lemos JA, Zirlik A, Schönbeck U, Varo N, Murphy SA, Khera A, McGuire DK, Stanek G, Lo HS, Nuzzo R, Morrow DA, Peshok R, Libby P. Associations Between Soluble CD40 Ligand, Atherosclerosis Risk Factors, and Subclinical Atherosclerosis: Results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2192-2195.
- 18) Desideri G, Cipollone F, Necozone S, Marini C, Lechiara MC, Taglieri G, Zuliani G, Fellin R, Mezzetti A, di Orio F, Ferri C. Enhanced soluble CD40 ligand and Alzheimer's disease: Evidence of a possible pathogenetic role. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 348-56.
- 19) Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Verlag Enke Ferdinand, 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, 1998
- 20) Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 360-367.
- 21) Erler K. Elecsys® immunoassay systems using electrochemiluminescence detection. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110 Suppl 3: 5-10.
- 22) Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJG. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002. 50: 451-459.
- 23) Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86: 222-32.
- 24) Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749-1754.
- 25) Grewal IS, Flavell RA. The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol Res* 1997; 16: 59-70.

- 26) Halldorsdottir AM, Stoker J, Porche-Sorbet R, Eby, CS. Soluble CD40 ligand measurement inaccuracies attributable to specimen type, processing time, and ELISA method. *Clin Chem* 2005; 51: 1054-1057.
- 27) Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1104-1111.
- 28) Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berhaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594.
- 29) Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; 98: 1047-1054.
- 30) Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA. Platelet CD40 Ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001; 12: 74-82.
- 31) Inwald DP, Faust SN, Lister P, Peters MJ, Levin M, Heyderman R, Klein NJ. Platelet and soluble CD40L in meningococcal sepsis. *Intensive Care Med* 2006; 32: 1432-1437.
- 32) Ivandic BT, Spanuth E, Haase D, Lestin HG, Katus HA. Increased Plasma Concentrations of Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndrome Depend on in Vitro Platelet Activation. *Clin Chem* 2007; 53 (1231-1234).
- 33) Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 381-392.
- 34) L'Allier PL, Tardif JC, Gregoire J, Joyal M, Lesperance J, Fortier A, Guertin MC. Sustained elevation of serum CD40 ligand levels one month after coronary angioplasty predicts angiographic restenosis. *Can J Cardiol* 2005; 21: 495-500.
- 35) Le D, Garcia A, Lohsoonthorn V, Williams MA. Prevalence and risk factors of hypercholesterolemia among Thai men and women receiving health examinations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 1005-14.
- 36) Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Simo R. Proinflammatory Cytokines, Insulin Resistance and Insulin Secretion in chronic Hepatitis C patients. *Diabetes Care* 2006; 29: 1096-1101.
- 37) Lee W, Sheu WH, Chen YT, Liu TJ, Liang KW, Ting CT, Lee WL. Circulating CD40 ligand is elevated only in patients with more advanced symptomatic peripheral arterial diseases. *Thromb Res* 2005; 118: 619-626.
- 38) Lee WL, Lee WJ, Chen YT, Liu TJ, Liang KW, Ting CT, Sheu WHH. The presence of metabolic syndrome is independently associated with elevated serum CD40ligand and disease severity in patients with symptomatic coronary artery disease. *Metabolism* 2006; 55: 1029-1034.

- 39) Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, Reyes-Moreno C, Lapointe R, Merhi Y, Wilkins JA, Mourad W. CD40 Ligand binds to $\alpha 5 \beta 1$ Integrin and Triggers Cell Signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 5143-5151.
- 40) Liang KW, Huey-Herng Sheu W, Lee WL, Liu TJ, Ting CT, Chen YT, Lee WJ. Coronary artery disease progression is associated with C-reactive protein and conventional risk factors but not soluble CD40 ligand. *Can J Cardiol* 2006; 22: 691-696.
- 41) Lim HS, Blann AD, Lip GYH. Soluble CD40 Ligand, Soluble P-Selectin, Interleukin-g, and Tissue Factor in Diabetes Mellitus. Relationships to Cardiovascular Disease and Risk Factor Intervention. *Circulation* 2004; 109: 2524-2528.
- 42) Lobbes MB, Lutgens E, Heeneman S, Cleutjens KB, Kooi ME, van Engelshoven JM, Daemen MJ, Nelemans, PJ. Is there more than C-reactive protein and fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, interleukin-6 and oxidized low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease. *Atherosclerosis* 2006; 187:18-25.
- 43) Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl: S89-95.
- 44) Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394: 200-203.
- 45) Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931-1936.
- 46) McCulloch RK, Summers J, Vandongen R, Rouse IL. Role of thromboxane A2 as a mediator of platelet-activating-factor-induced aggregation of human platelets. *Clin Sci (Lond)* 1989; 77: 99-103.
- 47) Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol* 1998; 80: 1008-1014.
- 48) Mylaguarnera M, Di Vazio I, Romeo MA, Restuccia S, Laurino A, Trovato BA. Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 1997; 32: 211-215.
- 49) Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory Effects of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists and Aspirin on the Release of Soluble CD40 Ligand During Platelet Stimulation. *Circulation* 2003; 107: 1123-1128.
- 50) Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand. *Circulation* 2002; 105: 2849-2854.

- 51) Prasad KS, Andre P, Yan Y, Phillips DR. The platelet CD40L/GP IIb-IIIa axis in atherothrombotic disease. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 356-361.
- 52) Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces β_3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *PNAS* 2003. 100: 12367-12371.
- 53) Santilli F, Davi G, Consoli A, Cipollone F, Mezzetti A, Falco A, Taraborelli T, Devangelio E, Ciabattini G, Basili S, Patrono C. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 391-397.
- 54) Schonbeck U, Libby P. CD40 Signaling and Plaque Instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092-1103.
- 55) Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and Cardiovascular Risk in Women. *Circulation* 2001; 104: 2266-2268.
- 56) Semb AG, van Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, Froland SS, Kastelein JJ, Gullestad L, Pedersen TR, Aukrust P, Stalenhoef AF. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003. 41: 275-279.
- 57) Sonmez A, Dogru T, Yilmaz MI, Ocal R, Ozgurtas T, Kilic S, Eyileten T, Tasci I, Erbil K, Kocar IH. Soluble CD40 ligand levels in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2005; 27: 629-634.
- 58) Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation* 2003; 108: 1917-1923.
- 59) Tayebjee MH, Lip GYH, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2, and CD40 Ligand Levels in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 339-345.
- 60) Tiong AY, Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart Journal* 2005; 150: 12-18.
- 61) Ueland T, Aukrust P, Yndestad A, Otterdal K, Froland SS, Dickstein K, Kjekshus J, Gullestad L, Damas JK. Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure. *Europ Heart J* 2005; 26: 1101-1107.
- 62) Urbich C, Dimmeler S. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol*. 2004 May 15;20(7):681-683. Review.
- 63) Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schonbeck U. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 1049-1052.

- 64) Varo N, Nuzzo R, Natal C, Libby P, Schonbeck U. Influence of preanalytical and analytical factors on soluble CD40L measurements. *Clin Sci (Lond)* 2006; 111: 341-347.
- 65) Vavuranakis M, Latsios G, Aggelis D, Bosinakou I, Karambelas I, Tousoulis D, Toutouzas K, Stefanadis C. Randomized comparison of the effects of ASA plus clopidogrel versus ASA alone on early platelet activation in acute coronary syndromes with elevated high-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand levels. *Clinical Therapeutics* 2006; 28: 860-871.
- 66) Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Déchanet J, Grosset C, Moreau JF, Praloran V, Nurden P, Pellegrin JL, Nurden AT, Ripoche J. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002; 99: 2612-2614.
- 67) Vishnevetsky D, Kiyani VA, Gandhi PJ. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother* 2004; 38(9): 1500-1508.
- 68) Wang J, Zhang S, Jin Y, Qin G, Yu L, Zhang J. Elevated levels of platelet-monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2007; 115: 361-365.
- 69) Weber M, Rabenau B, Stanisch M, Elsaesser A, Mitrovic V, Heeschen C, Hamm C. Influence of sample type and storage conditions on soluble CD40 ligand assessment. *Clin Chem* 2006; 52: 888-891.
- 70) Weber M, Rabenau B, Stanisch M, Nef HM, Mollmann H, Elsasser A, Mitrovic V, Heeschen C, Hamm C. Influence of sample type on soluble CD40 ligand assessment in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Res* 2007; 120: 811-814.
- 71) Yan JC, Ma GS, Wu ZG, Kong XT, Zong RY, Zhan LZ. Increased levels of CD40-CD40 ligand system in patients with essential hypertension. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 191-196.
- 72) Yazdany J, Davis J. The Role of CD40 Ligand in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13(5): 377-380.
- 73) Zhou ZX, Qiang H, Ma AQ, Chen H, Zhou P. [Measurement peripheral blood index related to inflammation and ox-LDL, ox-LDLAb in patients with coronary heart disease and its clinical significance]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 31: 258-262.
- 74) Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Brechot C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999; 30: 185-191.

8 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hannsjörg Baum recht herzlich für das Thema meiner Doktorarbeit und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für neu aufgetretene Fragen und Probleme und war mir immer ein zuverlässiger Ansprechpartner. Ebenso danke ich Dr. med. Christoph Schulz für seine aufwändige Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei allen organisatorischen Problemen und Schwierigkeiten im Labor.

Insbesondere Frau Huber danke ich für ihre Mühe und Geduld bei der Einführung in alle labormedizinischen Abläufe und Arbeiten sowie ihre Anleitung in Studien- und Versuchsdurchführung.

Herrn Jarausch und Roche Diagnostics danke ich für die Bereitstellung der Elecsys[®] sCD40L lot A-2 Reagenz sowie dem Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar München für die Erlaubnis zur Benutzung aller Materialien und Geräte, insbesondere des Elecsys[®] 2010 Analyser. Allen medizinisch-technischen Assistentinnen, vor allem aber den Mitarbeiterinnen im Notfalllabor, danke ich für das Sammeln und Vorbereiten aller Plasmaproben, ohne deren Hilfe die Durchführung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre!

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Merz und Herrn Frick für ihre Hilfe bei jeglichen Organisations- und EDV-Problemen.

Zu guter Letzt danke ich allen Freunden und Bekannten für ihre Blutspenden und insbesondere meinen Eltern Gertraud und Johannes Jaschul sowie meiner Freundin Andrea Jobst für ihre wertvollen Tipps wie auch allen anderen für ihre Geduld.