

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekt einer Tabakentwöhnung
auf die Anzahl endothelialer Progenitorzellen
und das kardiovaskuläre Risikoprofil**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Jasmin Steier
aus
Erfurt

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. K. Schäfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Patschan

3. Berichterstatter: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2016

Inhaltsverzeichnis

VERÖFFENTLICHUNG	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 Prävalenz, Morbidität und Mortalität des Rauchens	6
1.2 Tabakentwöhnung	7
1.3 Die endotheliale Dysfunktion als Initiator der Ausbildung atherosklerotischer Plaques	8
1.4 Bereits bekannte Marker der endothelialen Dysfunktion	9
1.5 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	11
1.5.1 Charakterisierung der EPC	12
1.5.2 EPC und endotheliale Dysfunktion	13
1.6 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	15
1.6.1 Bedeutung von ADMA als Inhibitor der NO-Synthase	15
1.6.2 ADMA und endotheliale Dysfunktion	16
1.7 Endotheliale Dysfunktion als Folge des Rauchens	16
1.7.1 EPC bei Rauchern	18
1.7.2 ADMA bei Rauchern	19
1.8 Zielsetzung	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Studiendesign und Probandenkollektiv	21
2.2 Charakteristik des Erfassungsbogens	22
2.3 Kohlenmonoxidmessung	23
2.4 Probenmaterial und Probenlagerung	23
2.5 Bestimmung von Lipidstatus, Entzündungswerten und hämatologischen Parametern	24
2.6 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl an CD 34 ⁺ , VEGFR2 ⁺ Zellen	25
2.6.1 Grundlagen	25
2.6.2 Durchführung	25
2.7 Isolierung und Kultivierung der humanen EPC	26
2.7.1 Durchführung	26
2.7.2 Zellkultivierung	27
2.7.3 Bestimmung von acLDL ⁺ , Lectin ⁺ Zellen	28
2.8 Bestimmung von ADMA im Serum	31

Inhaltsverzeichnis	4
<hr/>	
2.8.1 Grundlagen	31
2.8.2 Durchführung.....	31
2.9 Statistik.....	32
3 ERGEBNISSE	33
3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs.....	33
3.2 Kohlenmonoxidmessung.....	38
3.3 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die Anzahl kultivierbarer acLDL ⁺ , Lectin ⁺ Zellen.....	40
3.3.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs.....	40
3.3.2 Subgruppenvergleiche	41
3.4 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die mittels Durchflusszytometrie im peripheren Blut detektierbare Anzahl an CD 34 ⁺ , VEGFR2 ⁺ Zellen.....	45
3.4.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs.....	45
3.4.2 Subgruppenvergleiche	46
3.5 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die ADMA-Serumkonzentration	48
3.5.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs.....	48
3.5.2 Subgruppenvergleiche	49
3.6 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf weitere Biomarker eines erhöhten kardiovaskulären Risikos	49
4 DISKUSSION	52
4.1 Erfolg der Tabakentwöhnung.....	53
4.2 Einfluss der Tabakentwöhnung auf bekannte Marker endothelialer Dysfunktion	53
4.3 Einfluss der Raucherentwöhnung auf die Anzahl zirkulierender EPC	56
4.4 Einfluss der Raucherentwöhnung auf ADMA	61
4.5 Studienkritik.....	63
5 AUSBLICK.....	65
6 ZUSAMMENFASSUNG	66
7 ANHANG	67
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	67
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	69
7.3 Tabellenverzeichnis	69
8 LITERATURVERZEICHNIS	70

Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden vor Abschluss des Promotionsverfahrens im *International Journal of Cardiology* veröffentlicht.

Originalarbeit:

Puls M, Schroeter MR, Steier J, Stijohann L, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2011): Effect of smoking cessation on the number and adhesive properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol* 152, 61-69

1 Einleitung

Die Mehrzahl aller in den westlichen Industrienationen auftretenden Todesfälle sind die Folge atherosklerotischer Gefäßveränderungen, welche Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfall und periphere Gefäßerkrankungen (BRAUNWALD 1997) verursachen. Störungen einer intakten Endothelfunktion kommt eine zentrale Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zu (ROSS 1999). Rauchen gilt als bedeutender vermeidbarer Risikofaktor für atherosklerotische Prozesse und ist maßgeblicher Verursacher eines vorzeitigen Todes (JOHN und HANKE 2001, RUFF et al. 2000). Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Klärung der Mechanismen, die dem erhöhten Risiko von Rauchern für kardiovaskuläre Erkrankungen zugrunde liegen. Unter anderem könnte eine Erklärung für die schädigende Wirkung des Rauchens auf die Gefäße in einer verminderten Regeneration des Endothels sein. An der Endothelregeneration sind neben ortsständigen ausdifferenzierten Endothelzellen auch aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen (EPC) beteiligt (ASAHARA et al. 1997, TAKAHASHI et al. 1999, URBICH und DIMMELER 2004). Ferner konnten neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Störungen der Stickstoffmonoxid-Produktion im Initialprozess der Atherosklerose eine große Rolle einnehmen.

1.1 Prävalenz, Morbidität und Mortalität des Rauchens

Nach Angaben des Mikrozensus im Jahr 2009 sind etwa 26% der über 15-Jährigen in der Bundesrepublik Deutschland Raucher. Darunter bildet die männliche Bevölkerung mit 31% die Mehrheit gegenüber der weiblichen Bevölkerung mit 21% (Statistisches Bundesamt 2011). Der Anteil der Männer ist seit 1995 (36%) stetig gesunken, während der bei Frauen über die betrachteten Jahre konstant geblieben ist. Insgesamt bezeichnen sich 22% als regelmäßige Raucher. Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 16% bei einem täglichen Zigarettenkonsum von über 20 Zigaretten als starke Raucher einzustufen.

Rauchen verursacht eine Vielfalt von Erkrankungen, insbesondere Lungenerkrankungen, Malignome und kardiovaskuläre Erkrankungen. In ihren Empfehlungen zu Ernährung und Lebensstil publiziert die *American Heart Association* im Jahr 2000, dass die ungünstigen Effekte des Zigarettenrauchens in aktiver aber auch in passiver Form auf das kardiovaskuläre System zweifelsfrei erwiesen sind (KRAUSS et al. 2000). Das Inhalieren von Tabakrauch ist

für 21-47% der Herz-Kreislauf-Erkrankungen ursächlich verantwortlich (PARROTT et al. 1998). YUSUF et al. konnten eine starke Korrelation zwischen der Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag und dem Herzinfarkttrisiko nachweisen. So hat ein Raucher, der täglich 20 Zigaretten raucht, ein 3,8-mal höheres Infarkttrisiko als ein Nichtraucher, während bei einem Konsum von mehr als 40 Zigaretten pro Tag bereits ein 9,2-mal höheres Risiko besteht (YUSUF et al. 2004). Weltweit sterben nach WHO-Schätzungen derzeit jährlich ca. 6 Millionen Menschen an den Folgen des Tabakkonsums (WHO 2013). Ab dem Jahr 2020 wird mit einer Mortalität von über 10 Millionen Menschen pro Jahr gerechnet (PETO et al. 1996). In Deutschland ist Rauchen die häufigste Einzelursache für Krankheit und vorzeitigen Tod (JOHN und HANKE 2001, RUFF et al. 2000). DOLL et al. konnten in einer Langzeitstudie darlegen, dass über die Hälfte aller regelmäßigen Raucher an den Folgen des Rauchens frühzeitig verstirbt und die Lebenserwartung von Rauchern um 10 Jahre reduziert ist (DOLL et al. 2004, RAUPACH et al. 2006). Die ökonomischen Folgebelastungen für das Gesundheitswesen sind enorm, diese werden auf 21 Milliarden Euro geschätzt (NEUBAUER et al. 2006).

1.2 Tabakentwöhnung

Die WHO hat bereits im Jahr 2008 in ihrem Bericht bestätigt, dass die globale Tabakepidemie eine der größten Bedrohungen für das öffentliche Gesundheitswesen darstellt und zum Tod von einer Milliarde Menschen im Laufe des 21. Jahrhunderts führen könnte (WHO 2008). Zur Bekämpfung wird in dem Bericht das MPOWER-Programm empfohlen, ein Paket aus 6 erprobten Schlüsselstrategien gegen den Tabakkonsum: 1) Überwachung von Tabakkonsum und Präventionsmaßnahmen; 2) Nichtraucherschutz; 3) Angebote zur Tabakentwöhnung; 4) Aufklärung und Warnung; 5) Verbote für Tabakwerbung und 6) Anhebung der Tabaksteuer. Durch Umsetzung dieses Paketes können Millionen von Menschenleben gerettet werden. Die Bilanz im Jahr 2013: ca. 2,3 Milliarden Menschen, fast ein Drittel der Weltbevölkerung, wurden mittlerweile von den Maßnahmen zur Tabakkontrolle erreicht (WHO 2013). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass das relative Risiko für koronare Ereignisse durch eine Raucherentwöhnung nach 3 Jahren auf das eines Nichtrauchers sinkt (REA et al. 2002).

Es existieren zahlreiche Strategien und Interventionen wie Selbsthilfeprogramme, Kurzinterventionen, telefonische Beratung, individuelle Behandlung und Gruppenprogramme zur Verhaltensänderung Rauchender. Mit Hilfe von Beratung und Verhaltenstherapie der

Aufhörwilligen können Handlungsmuster durchbrochen und Strategien erarbeitet werden, um Rückfallsituationen und Entzugssymptomen entgegenzuwirken. Wird die Raucherentwöhnung pharmakologisch durch Nikotinersatzprodukte oder das seit 1999 zur Raucherentwöhnung zugelassene Antidepressivum Zyban® (Wirkstoff Bupropion) mit einem professionellem kognitiv-verhaltenstherapeutischem Programm kombiniert, können Abstinenzraten deutlich gesteigert werden (CHENOT und KELLER 2004, FELTEN et al. 2006).

1.3 Die endotheliale Dysfunktion als Initiator der Ausbildung atherosklerotischer Plaques

Der Begriff der endothelialen Dysfunktion wird zur Beschreibung einer Vielzahl pathologischer Situationen verwendet, in denen Störungen essentieller Endothelfunktionen auftreten. Schon 1980 konnten FURCHGOTT und ZAWADSKI in ihrer Arbeit mit isolierten Blutgefäßen von Kaninchen zeigen, dass eine Relaxation des Endothels nach Inkubation mit Acetylcholin von der Präsenz intakter Endothelzellen abhängig ist (FURCHGOTT und ZAWADSKI 1980). Später wurde der vasoaktive Mediator Stickstoffmonoxid (NO) als wichtigster Auslöser der endothelabhängigen Gefäßerweiterung identifiziert (MONCADA und HIGGS 1993, PALMER et al. 1988). In verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Schädigung des Endothels als Frühstadium der Atherosklerose assoziiert sind (KINLAY und GANZ 1997, ROSS 1999, VERMA und ANDERSON 2002). Diese Endotheldysfunktion geht dabei den morphologischen Veränderungen, die für die klinische Manifestation verantwortlich sind, voraus.

Das Endothel gilt als Hauptregulator der vaskulären Homöostase. Es bestimmt die Balance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Inhibition und Stimulation der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie Thrombogenese und Fibrinolyse. Die durch Schädigung hervorgerufene endotheliale Dysfunktion führt zu Kompensationsmechanismen, die die normalen homöostatischen Eigenschaften des Endothels verändern. Es kommt zu einer erhöhten Permeabilität für Lipoproteine sowie zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Thrombozyten. Durch oxidiertes LDL wird die Migration von Leukozyten in das Endothel vermittelt. Monozyten und Makrophagen transformieren dort durch Phagozytose oxidierter Lipoproteine zu sog. Schaumzellen, es bilden sich die sog. Fettstreifen. Das Endothel beginnt, vasoaktive Moleküle, Zytokine und

Wachstumsfaktoren zu sezernieren, wodurch die inflammatorische Reaktion weiter unterhalten wird. Es kommt zur Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen, zur Ausbildung einer fibrösen Kappe der Läsion und damit letztlich zu einer Verdickung der arteriellen Wand. Die anhaltende Entzündungsreaktion führt zur Einwanderung weiterer Lymphozyten und Makrophagen in die atherosklerotische Läsion, welche ihrerseits hydrolytische Enzyme und Zytokine sezernieren und damit fokale Nekrosen hervorrufen. Eine Ulzeration der fibrösen Kappe infolge überwiegender Proteolyse führt schließlich zur Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und damit zum Verschluss des arteriellen Lumens (ROSS 1999).

In einem einmal initiierten atherosklerotischen Prozess schreiten endotheliale Schädigungen fort und gehen in eine progressive Krankheit über. SCHÄCHINGER et al. konnten zeigen, dass Patienten mit nachgewiesener endothelialer Dysfunktion eine signifikant erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse aufweisen (SCHÄCHINGER et al. 2000). Diese Ergebnisse konnten in weiteren Studien bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (SUWAIDI et al. 2000) und peripher-arterieller Gefäßkrankheit (BREVETTI et al. 2003, GOKCE et al. 2003) reproduziert werden.

Aber auch bei asymptomatischen Kindern mit Hypercholesterinämie und jungen rauchenden Erwachsenen wurden bereits endotheliale Funktionsstörungen nachgewiesen. Diese Resultate implizieren, dass physiologisch relevante Modifikationen der Gefäßwand schon in der ersten Lebensdekade in Anwesenheit von schädigenden Stimuli einsetzen können (CELERMAJER et al. 1992). Ferner konnten auch Risikofaktoren wie Alter, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Hypertonie mit einer Endotheldysfunktion in Verbindung gebracht werden (CELERMAJER et al. 1994, SCHOFIELD 2002). Im Jahr 2004 belegte die INTERHEART-Studie, dass diese und weitere Risikofaktoren mit einer erhöhten Inzidenz, einen Myokardinfarkt zu erleiden, einhergehen (YUSUF et al. 2004).

1.4 Bereits bekannte Marker der endothelialen Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion stellt somit, wie oben dargestellt, ein Frühstadium in der Pathogenese der Atherosklerose dar. Ihre frühzeitige Diagnose wäre somit ein wertvoller diagnostischer und prognostischer Marker hinsichtlich des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen (VERMA et al. 2003). Folgerichtig wurden bereits mehrere diagnostische Methoden beschrieben.

Das klinische Korrelat einer Endotheldysfunktion ist eine Einschränkung der endothelvermittelten Vasodilatation. Diese lässt sich angiographisch nach Stimulation der koronaren oder peripheren Zirkulation gut beurteilen. Eine gestörte Endothelfunktion manifestiert sich angiographisch als abgeschwächte Vasodilatation bis hin zur paradoxen Vasokonstriktion nach Gabe vasoaktiver Substanzen (AYMONG et al. 2002, LUDMER et al. 1986). Diese invasive Untersuchungsmethode ist jedoch auf die Anwendung bei Patienten mit fortgeschrittenen kardiovaskulären Erkrankungen beschränkt und für ein wiederholtes Testen im Rahmen von Folgeuntersuchungen ungeeignet. Eine nichtinvasive Methode besteht im sonographischen Nachweis einer abgeschwächten flussvermittelten arteriellen Vasodilatation nach mechanischer Kompression mittels einer Druckmanschette (CORRETTI et al. 2002). JOHNSON et al. demonstrierten in einer großen, prospektiven Studie, dass durch Raucherentwöhnung eine endotheliale Dysfunktion (gemessen anhand einer signifikanten Steigerung der arteriellen Vasodilatationsfähigkeit) um 1% verbessert werden kann (JOHNSON et al. 2010).

Ferner konnten in der Vergangenheit zahlreiche biochemische prognostische Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden. Die Rolle der Lipide in der Pathogenese der Atherosklerose ist in zahlreichen Publikationen seit den 70er Jahren dargestellt worden. Im Rahmen von Dyslipoproteinämien besitzen vor allem hohe Werte an Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeriden sowie niedrige Plasmaspiegel an HDL-Cholesterin eine atherogene Wirkung (LEVY und KANNEL 1988). Daneben reduziert insbesondere das LDL-Cholesterin über eine verminderte NO-Freisetzung aus dem Endothel auch die Vasomotorik der Blutgefäße (SEILER et al. 1993, ZEIHNER et al. 1993). Über den Nutzen der HDL-Cholesterin-Erhöhung, insbesondere durch medikamentöse Therapien, wird aktuell sehr kontrovers diskutiert, jedoch gelten laut Empfehlung der *American Association of Clinical Endocrinologists* HDL-Spiegel >40 mg/dl als erstrebenswert. Es fanden sich aber auch Hinweise darauf, dass eine HDL-Cholesterin-Konzentrationen >60 mg/dl als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt (JELLINGER et al. 2012).

Als bedeutendste Prädiktoren endothelialer Dysfunktion zeigten sich die Akutphaseproteine Fibrinogen und hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP), die bereits in frühesten atherosklerotischen Läsionen, aber auch in komplizierten Plaques nachweisbar sind (DANESH et al. 1998, YARNELL et al. 2000). Fibrinogen ist aktiv an der Entwicklung atherosklerotischer Plaques durch Erhöhung der Plasmaviskosität und eine verstärkte Plättchenaggregation beteiligt (KOENIG und ERNST 1992, LETCHER et al. 1981). Erhöhte

Fibrinogen-Spiegel korrelieren mit dem Ausmaß der Atherosklerose und gelten als Risikofaktor für KHK, peripher-arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Apoplex (ERNST und RESCH 1993). CRP konnte als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK und ihrer Folgen identifiziert werden, wobei initial erhöhte Werte ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bedeuten (RIDKER 2003). Seit dem Nachweis von CRP in atherosklerotischen Läsionen wird vermutet, dass CRP nicht nur einen Indikator des ablaufenden Entzündungsprozesses in atheromatösen Plaques darstellt, sondern diesen auch begünstigt und selbst für Vorgänge der frühen Atherogenese verantwortlich gemacht werden kann. Ferner spielt CRP eine Rolle in der Hemmung der NO-Produktion durch endotheliale Zellen (VERMA et al. 2002). Zur Vorhersage kardiovaskulärer Ereignisse wurden hochsensitive CRP-Assays entwickelt, mit denen CRP-Konzentrationen mit adäquater Sensitivität bestimmt werden können und nun in der klinischen Praxis Verwendung finden (RIFAI und RIDKER 2001, ROBERTS et al. 2001). Nach den Empfehlungen der *Centers for Disease Control and Prevention* und der *American Heart Association* erfolgt die Risikoeinstufung nach dem hsCRP-Spiegel in niedrig (<1 mg/l), moderat (1-3 mg/l) und hoch (>3 mg/l) für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (PEARSON et al. 2003).

Die Arbeit weiterer Studien könnte die prädiktiven Eigenschaften der genannten oder aber neuer Marker der endothelialen Dysfunktion bestätigen, so dass in der Zukunft nichtinvasive Messmethoden für eine effektivere Prävention zur Verfügung stehen könnten. Eine positive Testung würde dann eine pharmakologische Behandlung bei asymptomatischen Personen mit moderatem Risikoprofil rechtfertigen (GREENLAND et al. 2001).

1.5 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Vor dem Hintergrund, dass die Entwicklung der Atherosklerose auf einer funktionellen und morphologischen Endothelschädigung basiert, ist die Rolle endothelialer Progenitorzellen insbesondere bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren hinsichtlich Erhalt und Wiederherstellung einer intakten Endothelzellschicht von großer Bedeutung. EPC besitzen außerdem das Potential, als diagnostische und prognostische Marker auf zellulärer Ebene für die Beurteilung der endothelialen Funktion und die Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse zu dienen.

1.5.1 Charakterisierung der EPC

Das adulte Knochenmark enthält einen Subtyp von Vorläuferzellen, welche das Potential besitzen, sich in reife Endothelzellen zu differenzieren, weshalb diese auch als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet werden. Sie können derzeit nur aus dem peripheren Blut, Knochenmark und Blut der Nabelvenen isoliert werden.

Beschrieben wurden zirkulierende EPC bereits Anfang der 70er Jahre im peripheren Blut anhand morphologischer Merkmale (BOUVIER et al. 1970). Heute dienen die Antigene CD34, AC133 und VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor-2*) als typische Oberflächenmarker der EPC. Im menschlichen Organismus wird der VEGF-Rezeptor-2 auch als *Kinase-inserted domain containing receptor* (KDR) und in der Maus als *Fetal liver kinase-1* (FLK-1) bezeichnet (CINES et al. 1998, ZIEGLER et al. 1999). Die gleichzeitige Expression der Marker CD34 und VEGFR2 kennzeichnet ihre Eigenschaft als hämatopoetische Stammzellen und Endothelzellen (ASAHARA et al. 1997, FINA et al. 1990, ZIEGLER et al. 1999). Mit der Entdeckung des Oberflächenproteins AC133 (MIRAGLIA et al. 1997, YIN et al. 1997) wurde ein Marker identifiziert, der als spezifisch für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen gilt und der Abgrenzung zu reifen Endothelzellen dient. Zur Charakterisierung zirkulierender EPC setzten PEICHEV et al. für durchflusszytometrische Untersuchungen die Dreifachkombination mit CD34, AC133 und VEGFR2 ein und zeigten, dass der Anteil der zirkulierenden CD34⁺ Zellen, die AC133 und VEGFR2 exprimieren, bei lediglich 2% liegt (PEICHEV et al. 2000). In den meisten Studien wird die Kombination aus zwei Markern zur Quantifizierung verwendet, entweder CD34 und VEGFR2 oder AC133 und VEGFR2.

Eine andere Methode zur Anreicherung der EPC besteht in der Kultivierung auf Fibronectin in einem für Endothelzellen spezifischen Medium mit bestimmten Zusätzen und Wachstumsfaktoren. Die adhärenen Zellen verlieren durch die Kulturbedingungen ihre Progenitoreigenschaften und nehmen mehr und mehr die phänotypischen Charakteristika von Endothelzellen, wie beispielsweise die typische spindelzellförmige Morphologie, an. Diese Zellen zeichnen sich durch die Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein (acLDL) und die Bindung von bestimmten zuckerbindenden Oberflächenproteinen, sog. Lectinen, aus (ASAHARA et al. 1997, KALKA et al. 2000, KAUSHAL et al. 2001, SHI et al. 1998). Weitere typische Endothelzellmarker, die in Kultur exprimiert werden, sind CD31, VEGFR2, von Willebrand-Faktor und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (ASAHARA et al. 1997, GULATI et al. 2003, SHI et al. 1998).

1.5.2 EPC und endotheliale Dysfunktion

Einen besonderen Stimulus für die Mobilisierung der EPC stellt die Gewebeischämie dar. So wurde nach belastungsinduzierter Myokardischämie (ADAMS et al. 2004) und nach akutem Myokardinfarkt (MASSA et al. 2005, SHINTANI et al. 2001) eine erhöhte Anzahl von EPC im peripheren Blut gefunden. Darüber hinaus deuten zahlreiche Untersuchungen darauf hin, dass infolge einer Sekretion von Zytokinen EPC aus dem Knochenmark mobilisiert und zu Gefäß- oder Gewebeerletzungen rekrutiert werden, wo sie sich an Reparaturprozessen und der Neovaskularisation beteiligen (ASAHARA et al. 1999, TAKAHASHI et al. 1999, URBICH und DIMMELER 2004). KAWAMOTO et al. wiesen das regenerative Potential der EPC im Rattenmodell nach: Nach Induktion einer Myokardischämie und Applikation von ex vivo expandierten humanen EPC konnte eine Inkorporation dieser Zellen im Ischämiegebiet sowie ihre Differenzierung in reife endotheliale Zellen beobachtet werden (KAWAMOTO et al. 2001).

Neben der Beteiligung an der Gefäßneubildung sind die EPC auch an der Reendothelialisierung, der Wiederherstellung einer intakten Endothelzellschicht, von verletzten Gefäßen beteiligt (ASAHARA et al. 1997, URBICH und DIMMELER 2004, TAKAHASHI et al. 1999). Dies impliziert, dass die endotheliale Integrität nicht nur vom Ausmaß der Verletzung, sondern auch von der endogenen Reparaturkapazität abhängt. Somit könnte eine vaskuläre endotheliale Dysfunktion mit einem relativen Defizit an EPC für Reparaturmechanismen einhergehen (HILL et al. 2003).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren können die Verfügbarkeit und Funktion der EPC ebenso verändern. Insbesondere weisen Typ-II-Diabetiker nicht nur eine verminderte Anzahl an zirkulierenden EPC auf, sondern auch deren Funktion scheint gestört zu sein (TEPPER et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Lee untersuchte ein Kollektiv aus Typ-II-Diabetikern und konnte einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten Anzahl an EPC und der Ausbildung atherosklerotischer Plaques in den Carotiden darstellen (MOON et al. 2012). Weitere klinische Studien konnten nachweisen, dass die Anzahl zirkulierender EPC negativ mit dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren entsprechend der Kriterien des *Framingham Risk Factor Score* korreliert (HILL et al. 2003, VASA et al. 2001b). In der Arbeit von VALGIMIGLI et al. wiesen Patienten mit einer Herzinsuffizienz vom Grad NYHA I-II eine signifikant höhere Anzahl an EPC auf, interessanterweise fanden sich aber bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz Grad NYHA IV signifikant niedrigere Spiegel (VALGIMIGLI et al. 2004). Ein ähnliches Bild zeigten Patienten mit pAVK, wobei im frühen Stadium IIa,

klassifiziert nach Fontaine, deutlich höhere EPC-Level detektiert wurden als bei Patienten im Stadium IV und in der Kontrollgruppe (MORISHITA et al. 2012). Andererseits wurde bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK eine höhere Anzahl an zirkulierenden EPC gefunden (SHINTANI et al. 2001). Es wird diskutiert, ob die Anzahl der EPC bei Patienten mit KHK zur Prognoseeinschätzung gut geeignet ist und somit eine klinische Relevanz als Biomarker resultieren kann. So besteht eine signifikante, negative Korrelation zwischen dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und der Anzahl zirkulierender EPC im peripheren Blut (SCHMIDT-LUCKE et al. 2005, WERNER et al. 2005).

Nicht nur pathologische Zustände führen zu einer Veränderung von Anzahl und Funktion der EPC. So können die EPC auch durch physiologische Faktoren beeinflusst werden. Bei Frauen und im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Östrogenen zu einer Erhöhung der CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen führt. Darüber hinaus konnte bei östrogenstimulierten weiblichen Mäusen nach Gefäßverletzung eine reduzierte Neointimahyperplasie nachgewiesen werden (STREHLOW et al. 2003). In einer weiteren Studie wurde der Einfluss körperlichen Trainings untersucht, und es zeigte sich, dass regelmäßiger Sport ebenfalls mit einer Erhöhung der EPC, einer Proliferationshemmung der Neointima und einer Stimulation der Angiogenese assoziiert ist (LAUFS et al. 2004). Zahlreiche Arbeiten haben überdies den Einfluss von HMG-CoA-Synthasehemmern (Statinen) auf die Mobilisation der EPC untersucht und gefunden, dass die Applikation dieser Medikamente eine Erhöhung der zirkulierenden EPC erzielte (VASA et al. 2001a, WALTER et al. 2002, WERNER et al. 2002). WALTER et al. konnten ferner nach balloninduzierter Gefäßverletzung bei Statin-behandelten Ratten eine verbesserte Reendothelialisierung assoziiert mit einer signifikant reduzierten Proliferation der Neointima beobachten (WALTER et al. 2002). Andere Forschungsergebnisse weisen aber auch darauf hin, dass eine längerfristige Behandlung mit Statinen in einer Abnahme isolierter EPC bei Patienten mit KHK resultiert (HRISTOV et al. 2007). Auch die Applikation von Chemokinen und Zytokinen wie VEGF (KAWAMOTO et al. 2004) oder Erythropoetin (HEESCHEN et al. 2003) kann in einer gesteigerten Mobilisierung der EPC resultieren.

1.6 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass das asymmetrische Dimethylarginin ein Mitverursacher und Biomarker der endothelialen Dysfunktion zu sein scheint (BÖGER 2003, COOKE 2000, COOKE 2004, MIYAZAKI et al. 1999). Eine erhöhte ADMA-Konzentration im Blut wird für einen Mangel an biologisch verfügbarem Stickstoffmonoxid verantwortlich gemacht.

1.6.1 Bedeutung von ADMA als Inhibitor der NO-Synthase

ADMA ist ein natürlich vorkommendes Derivat des L-Arginins. Es entsteht bei der posttranslationalen Modifikation von argininhaltigen Proteinen, wobei Protein-Arginin-Methyltransferasen-1 (PRMT-1) die endständigen Stickstoffatome der Guanidinogruppe methylieren. Die Freisetzung von ADMA erfolgt durch Proteolyse methylierter Proteine. Eine Reihe von Zellen einschließlich humaner Endothelzellen bildet und verstoffwechselt ADMA (LEIPER et al. 1999). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, die suggerierten, dass ADMA ausschließlich renal eliminiert wird, weisen spätere Studien auf eine Metabolisierung durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) hin (KIMOTO et al. 1995, LEIPER et al. 1999). Die DDAH inaktiviert ADMA durch Hydrolyse zu L-Citrullin und Dimethylarginin und ist für mehr als 90% des Abbaus verantwortlich.

Große Bedeutung erlangte ADMA durch die Erkenntnis, dass es als falsches Substrat kompetitiv die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) inhibiert (VALLANCE et al. 1992b). Die NOS bewirkt die Bildung von NO durch Oxidation von L-Arginin. Eine der wichtigsten Funktionen des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus, wobei die Freisetzung des Mediators NO durch die endotheliale NOS zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führt (FURCHGOTT und ZAWADSKI 1980). Zusätzlich zur vasodilatatorischen Eigenschaft hemmt NO in der Zirkulation die Thrombozytenaggregation (RADOMSKI et al. 1987), die Adhäsion und Migration von Leukozyten (KUBES et al. 1991) und die Proliferation glatter Muskelzellen (GARG und HASSID 1989). Des Weiteren schützt NO die Zellen durch Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (WINK et al. 1993) und agiert als Inhibitor der LDL-Oxidation (HOGG et al. 1993). Aufgrund dieser vasoprotektiven Eigenschaften wird NO auch als „endogenes anti-atherosklerotisches Molekül“ betrachtet (COOKE und TSAO 1994).

Durch die Arbeit von LEIPER et al. konnte gezeigt werden, dass die DDAH II, eine Isoform der DDAH, mit der endothelialen NOS ko-lokalisiert ist (LEIPER et al. 1999). Es wird

vermutet, dass die Regulation von ADMA aktiv und zellspezifisch in den Zellen erfolgt, die NO produzieren. Darüber hinaus konnte eine weitere Arbeit eine direkte Inhibierung der DDAH-Aktivität durch endogenes und exogenes NO nachweisen (LEIPER et al. 2002). Somit könnte dieses System bestehend aus NO, DDAH, ADMA und NOS als ein Regelkreis betrachtet werden, der die NO-Produktion und damit gleichbedeutend die endotheliale Funktion moduliert.

1.6.2 ADMA und endotheliale Dysfunktion

VALLANCE et al. waren 1992 die ersten, die ADMA als endogenen Inhibitor der NOS bei Patienten mit Niereninsuffizienz identifizierten (VALLANCE et al. 1992a). In diesen Dialysepatienten akkumulierte ADMA infolge einer reduzierten renalen Clearance. Aber nicht nur bei niereninsuffizienten Patienten fanden sich erhöhte ADMA-Spiegel, sondern auch bei Patienten mit gesteigerter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. So zeigten MIYAZAKI et al., dass erhöhte ADMA-Konzentrationen im Plasma von Probanden ohne kardiovaskuläre Erkrankung mit den Risikofaktoren Alter, Hypertonie und Diabetes positiv korrelieren (MIYAZAKI et al. 1999). BÖGER et al. fanden erhöhte ADMA-Spiegel bei Patienten mit Hypercholesterinämie assoziiert mit einer gestörten endothelabhängigen Vasodilatation der Brachialarterie (BÖGER et al. 1998a). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Infusion von ADMA bei gesunden Probanden zu einem signifikanten Anstieg von Blutdruck und systemischem Widerstand führt (ACHAN et al. 2003, KIELSTEIN et al. 2004). Erhöhte ADMA-Spiegel korrelieren aber auch mit anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie KHK (KREMPL et al. 2005), Schlaganfall (YOO und LEE 2001), kongestiver Herzinsuffizienz (USUI et al. 1998) und pAVK (BÖGER et al. 1998b). Im Tiermodell konnte nach balloninduzierter Gefäßverletzung demonstriert werden, dass regenerierte endotheliale Zellen mehr ADMA produzieren. Weiterhin resultierte eine signifikant erhöhte Neointima-Bildung begleitet von einer reduzierten endothelvermittelten Vasodilatation (AZUMA et al. 1995).

1.7 Endotheliale Dysfunktion als Folge des Rauchens

Zahlreiche Studien konnten bereits den schädlichen Einfluss des Rauchens auf die Vasomotorik demonstrieren. Es ist gut belegt, dass Rauchen zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks führt (MAHMUD und FEELY 2003). In-vivo-Studien an Hamstern

zeigten eine gestörte endothelvermittelte Dilatation der peripheren Widerstandsgefäße nach Infusion von Nikotin (MAYHAN und KAUSHIK 1997).

Störungen dieser funktionellen Endothelmechanismen konnten insbesondere bei Rauchern nachgewiesen werden. Mittels nichtinvasiver Messung der Gefäßmotorik zeigten klinische Studien bei Rauchern eine gestörte Dilatationsfähigkeit (CELERMAJER et al. 1993, HEITZER et al. 1996, NEUNTEUFL et al. 2002, ZEIHNER et al. 1995).

Der endothelialen Dysfunktion kommt eine große Bedeutung im Hinblick auf die frühe Diagnostik und rechtzeitige Therapie zu, da sie als Vorläufer der Atherosklerose diagnostisch fassbar, aber noch reversibel ist. Diesem Aspekt nahmen sich MORENO et al. an, die in ihrer Arbeit demonstrierten, dass nach Rauchstopp schon innerhalb von 24 Stunden eine gestörte Dilatation von Handvenen rückführbar war (MORENO et al. 1998).

Die INTERHEART-Studie bezeichnet erhöhte Blutfette und Zigarettenrauchen als die wichtigsten Risikofaktoren, einen Myokardinfarkt zu erleiden (YUSUF et al. 2004). Neben ihrer Bedeutung für die Entstehung der Atherosklerose und rheologischen Eigenschaften des Blutes haben auch die Lipoproteine einen Einfluss auf die Vasomotorik (SEILER et al. 1993, ZEIHNER et al. 1993). Insbesondere das LDL-Cholesterin vermindert die Freisetzung von NO aus dem Gefäßendothel. Raucher weisen im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant höhere Serumkonzentrationen von Gesamt-Cholesterin und LDL-Cholesterin sowie niedrigere Konzentrationen von HDL-Cholesterin auf (CRAIG et al. 1989, MJØS 1988). Die Abnahme an HDL-Cholesterin führt konsekutiv zu einer Änderung der LDL/HDL-Ratio und bewirkt somit wiederum ein höheres atherogenes Profil bei Rauchern. FREEMAN et al. konnten zeigen, dass 40% der untersuchten Raucher eine LDL/HDL-Ratio >4 aufwiesen, was in ihrer Studie mit einem sehr hohen Risiko für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses assoziiert war (FREEMAN et al. 1993). Frühere Untersuchungen zeigten, dass ein Rauchstopp insbesondere mit einem Anstieg des vermeintlich protektiven HDL-Cholesterins bis hin zur Normalisierung auf das Niveau eines Nichtrauchers einhergeht (MOFFAT 1988, STUBBE et al. 1982).

Überdies gilt das Rauchen als starker Stimulus einer erhöhten Produktion der Akutphaseproteine Fibrinogen und CRP. Patienten mit stattfindender Akute-Phase-Reaktion weisen eine erhöhte Prävalenz an atherosklerotischen Plaques auf. Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Atherosklerose ist inzwischen gut belegt (ROSS 1999). Erhöhte Konzentrationen der genannten Biomarker konnten in früheren prospektiven Studien mit einem erhöhten Risiko für spätere kardiovaskuläre Ereignisse in Verbindung gebracht werden

(DANESH et al. 1998, RIDKER 2003). So fanden sich im Blut von Rauchern höhere Werte an CRP und Fibrinogen als bei Nichtrauchern (BAZZANO et al. 2003, ROHDE et al. 1999, YARNELL et al. 2000, YASUE et al. 2006). Diese Daten implizieren, dass erhöhte Konzentrationen an CRP und Fibrinogen bei Rauchern möglicherweise am proinflammatorischen und proatherogenen Effekt des chronischen Tabakkonsums mitwirken.

1.7.1 EPC bei Rauchern

Bisher gibt es wenige Studien darüber, welche Bedeutung das Rauchen auf die aus dem Knochenmark stammenden EPC besitzt. In der Arbeit von VASA et al. wurde das Rauchen als einziger unabhängiger Prädiktor einer verminderten Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen identifiziert (VASA et al. 2001b). Den direkten Effekt des Rauchens bei Gesunden ohne zusätzliche Risikofaktoren und Erkrankungen überprüften MICHAUD et al., wobei der Nikotinabusus mit einer verminderten Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen assoziiert war (MICHAUD et al. 2006). Ferner veröffentlichten KONDO et al. als erste Arbeitsgruppe den Einfluss einer Raucherentwöhnung auf die Anzahl zirkulierender EPC. Eine Gruppe von 15 gesunden Männern wurde bezüglich ihres Rauchverhaltens in leichte und starke (≥ 20 Zigaretten pro Tag) Raucher eingeteilt und mit Nichtrauchern verglichen. Das Studienprotokoll setzte sich aus mehrzeitigen Zellmessungen über einen Gesamtzeitraum von 4 Wochen zusammen. Alle Probanden nahmen nach Entwöhnung ihr Rauchverhalten wieder auf, so dass nach 4 Wochen eine weitere Messung erfolgte. Da die Kultivierung der EPC von starken Rauchern nicht gelang, erfolgten weitere Messungen mittels FACS. Hierfür wurden Progenitorzellen (PC) durch die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD133 und endotheliale Progenitorzellen (EPC) durch CD45, CD34, CD133, VEGFR2 definiert. Es konnte hier demonstriert werden, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern eine signifikant reduzierte Anzahl an PC (CD45^{low}, CD34⁺, CD133⁺ Zellen) besitzen und diese umso geringer war, je mehr Zigaretten geraucht wurden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Raucherentwöhnung zu einer Zunahme dieser PC auf das Niveau der Nichtraucher führte. Die Wiederaufnahme der Rauchgewohnheiten resultierte in einer erneuten Reduktion zirkulierender PC. Ein ähnliches Verhalten wurde für die EPC (CD45^{low}, CD34⁺, CD133⁺, VEGFR2⁺ Zellen) nachgewiesen, jedoch waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant (KONDO et al. 2004).

Andererseits konnte das Rauchen und insbesondere das Nikotin als starker Stimulus für die Mobilisierung der EPC identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass eine Nikotinexposition in vitro zu einer EPC-Erhöhung führen kann (WANG et al. 2004). Diesen Effekt konnten

HEESCHEN et al. in vitro ebenfalls darlegen. Zusätzlich konnte hier im Mausmodell nach Induktion einer Hinterlaufischämie die systemische Nikotingabe EPC-Level steigern (HEESCHEN et al. 2006). Auch die Exposition gesunder Nichtraucher mit Passivrauch bewirkte einen Anstieg der EPC-Konzentration (Heiss et al. 2008a).

1.7.2 ADMA bei Rauchern

In der Arbeit von MIYAZAKI et al. konnte eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten ADMA-Spiegel und den kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, Hypertension und Diabetes detektiert werden, jedoch fand sich kein Zusammenhang zum Rauchen (MIYAZAKI et al. 1999). MAAS et al. zeigten in einer prospektiven Studie, dass das höchste Risiko für das Erleiden koronarer Ereignisse bei gesunden Rauchern mit einer niedrigen ADMA-Konzentrationen einhergeht (MAAS et al. 2007). Andere Studien konnten dagegen nachweisen, dass ein Tabakkonsum auch einen gegenteiligen Effekt auf die ADMA-Konzentration haben kann. Untersuchungen an Patienten mit KHK wiesen nach, dass bei Rauchern signifikant höhere ADMA-Werte vorliegen (SCHNABEL et al. 2005, WANG et al. 2006). Die Arbeit von SOBCZAK et al. untersuchte ein relativ großes Kollektiv aus 231 gesunden Männern und fand, dass im Vergleich die Raucher signifikant höhere ADMA-Level aufwiesen (SOBCZAK et al. 2014). ZHANG et al. demonstrierten diesen Zusammenhang bereits 2006 an 12 gesunden Rauchern. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe in vitro zeigen, dass die Inkubation endothelialer Zellen mit einem Extrakt aus Zigarettenrauch (*cigarette smoke extract*, CSE) zu einem Anstieg der intrazellulären ADMA-Konzentration führte (ZHANG et al. 2006).

Die Regulation der ADMA-Konzentration im Plasma erfolgt im Wesentlichen durch zwei Enzyme: Bildung durch die PRMT-1 und Abbau durch die DDAH. Eine Akkumulation von ADMA könnte folglich ebenfalls durch eine gestörte Aktivität dieser Enzyme begründet sein. Es konnte bisher gezeigt werden, dass zahlreiche Faktoren Einfluss auf die Expression und Aktivität dieser Enzyme nehmen. In Hinsicht auf die Wirkung des Rauchens konnten Untersuchungen bei Ratten darlegen, dass eine orale Gabe von Nikotin zu einer verminderten Aktivität der DDAH in endothelialen Zellen führt, assoziiert mit einer Abnahme des ADMA-Metabolismus (JIANG et al. 2006). Auch in der Arbeit von ZHANG et al. wurde infolge des oxidativen Stresses, induziert durch Rauchextrakt, die Aktivität der DDAH inhibiert (ZHANG et al. 2006). Jedoch wurden bei Versuchen mit ähnlich experimentellem Ansatz auch hier unterschiedliche Resultate präsentiert. So demonstrierten MAAS et al. anhand von

Zellkulturarbeiten, dass eine 48-stündige Exposition mit Zigarettenextrakt verminderte ADMA-Spiegel zur Folge hat. Experimentell schien dies durch eine Hochregulation der DDAH erklärbar zu sein (MAAS et al. 2007).

Im Kaninchenmodell wurde gezeigt, dass nach Endothelentfernung der rechten Arteria carotis eine orale Nikotinapplikation über 7 Wochen in einer beschleunigten Intima-Hyperplasie resultiert, verglichen mit der nicht operierten linken Seite. Diese akzelerierte Proliferation der Intima war ferner mit einer gestörten NO-Produktion und einem Anstieg der ADMA-Konzentration assoziiert (HAMASAKI et al. 1997). CHALON et al. konnten eine gestörte Vasodilatation nach Nikotinexposition später bei gesunden Nichtrauchern an Handvenen ebenfalls aufzeigen (CHALON et al. 2000). Diese Resultate implizieren eine durch Nikotin induzierte endotheliale Dysfunktion im Zusammenhang mit erhöhten ADMA-Konzentrationen.

1.8 Zielsetzung

Im Kontext dieser Erkenntnisse sollte in der vorliegenden prospektiven Studie untersucht werden, inwiefern sich eine systematische Raucherentwöhnung auf Risikomarker und Prädiktoren der endothelialen Dysfunktion auswirkt. Dabei standen in den Untersuchungen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Kann eine Tabakentwöhnung die Anzahl kultivierbarer EPC als potentielle Mediator / Vermittler endothelialer Reparaturmechanismen steigern?
2. Kann die Serumkonzentration von ADMA als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase durch eine Tabakentwöhnung gesenkt werden?
3. Welche Wirkung zeigt die Tabakentwöhnung auf den Lipoproteinstatus und die kardiovaskulären Risikomarker hoch-sensitives C-reaktives Protein und Fibrinogen?

Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, die sich auf junge, gesunde Individuen konzentrierten, wurden in diese Arbeit auch Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen eingeschlossen. Davon ausgehend wurden Untergruppen gebildet, um die Frage zu klären, ob es bei Probanden mit kardiovaskulärem Risikoprofil und solchen ohne Risikofaktoren zu unterschiedlichen Einflüssen einer Raucherentwöhnung auf die genannten Marker kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Probandenkollektiv

Seit Mai 2003 ist der „Nichtraucherschutz“ in der Universitätsmedizin Göttingen geregelt und wird konsequent umgesetzt. Als zentraler Baustein wurde bereits Anfang 2002 in diesem Konzept die Raucherentwöhnungsambulanz unter der Betreuung von Diplom-Psychologen in Zusammenarbeit mit Ärzten im Herzzentrum eingerichtet. Zentraler Bestandteil des Programms sind etablierte und evaluierte kognitive, verhaltenstherapeutische und pharmakologische Methoden (FELTEN et al. 2006, PARROTT et al. 1998, RAW et al. 1998). Die Gesprächsgruppen sind nach dem Kurskonzept „Nichtraucher in 6 Wochen“ von Professor Dr. med. Anil Batra und Professor Dr. med. Gerhard Buchkremer strukturiert (BATRA und BUCHKREMER 1997). Nach einem 30-minütigen Vorgespräch folgen im wöchentlichen Abstand 6 Sitzungen (eine Sitzung pro Woche) von jeweils 90-120 Minuten Dauer. In einer Gruppe von maximal 14 Personen erhalten die Teilnehmer psychologische Unterstützung auf medizinisch-wissenschaftlicher Basis. Ferner werden pharmakologische Hilfen wie eine Nikotinersatztherapie und Antidepressiva erklärt und empfohlen. Zwischen der ersten und dritten Sitzung wählt der Aufhörwillige selbst einen festen Termin für das Einstellen des Tabakkonsums. In einer eigenen Studie der Mitarbeiter des Raucherentwöhnungsprogramms über einen Zeitraum von 21 Monaten konnten am Ende des Kurses 72,0%, nach 6 Monaten 37,6% und nach 12 Monaten 27,1% der Probanden als rauchfrei evaluiert werden. Der Zigarettenkonsum der Teilnehmer, die am Ende des Programms nicht rauchfrei waren, konnte mehr als halbiert werden (FELTEN et al. 2006). Zur Validierung der Selbstaussage zum Rauchverhalten dient die Messung des Kohlenmonoxidgehaltes in der Ausatemluft. Der Teilnehmer wurde als kontinuierlicher Nichtraucher eingestuft, wenn er seit Kursende nicht mehr als 5 Zigaretten geraucht hatte (WEST et al. 2005) sowie einen endexpiratorischen CO-Gehalt unter 6 ppm aufwies (MIDDLETON und MORICE 2000).

Im Rahmen der vorliegenden prospektiven Studie wurden von August 2004 bis April 2006 Teilnehmer des Raucherentwöhnungsprogramms an der Universitätsmedizin Göttingen untersucht. Die Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigte das Studienprotokoll (Antragsnummer: 4/6/04). Jeder Proband wurde über den Ablauf der Studie unterrichtet und sein Einverständnis über die freiwillige Teilnahme eingeholt. Die Evaluation

der Basisdaten und Blutentnahme erfolgte zu Kursbeginn, nach 5 Wochen und 6 Monate nach Beendigung des Kurses. Als Haupteinschlusskriterium galt die erfolgreiche Teilnahme am Raucherentwöhnungskurs. Ausgeschlossen wurden somit alle Teilnehmer, die einen Zigarettenkonsum von mehr als 5 Zigaretten täglich oder einen CO-Gehalt von mehr als 6 ppm in der Ausatmluft aufwiesen. Zusätzlich sollte eine nach der Erstevaluation begonnene Therapie mit HMG-CoA-Synthasehemmern (Statine) oder Cholesterin-Resorptionshemmern zum Ausschluss führen. Die Auswahl der Probanden erfolgte unabhängig von Alter und Geschlecht sowie etwaigen Begleiterkrankungen. Insgesamt wurden 115 Kursteilnehmer eingeschlossen, nach Überprüfung der oben genannten Auswahlkriterien waren 67 Probanden für diese Studie geeignet. Dieses Kollektiv wurde nach 6 Monaten wiederholt kontaktiert, um langfristige Veränderungen der untersuchten Parameter zu evaluieren. Hier konnten 24 ehemalige Raucher eingeschlossen werden.

2.2 Charakteristik des Erfassungsbogens

Die Evaluation von Basisdaten, kardiovaskulären Risikofaktoren und Begleiterkrankungen erfolgte durch einen standardisierten Erfassungsbogen, der anonymisiert verarbeitet und elektronisch gespeichert wurde. Zu den Basisdaten zählten Angaben zu Alter, Geschlecht sowie Gewicht und Größe. Eine detaillierte Erhebung der Rauchgewohnheiten erfolgte anhand von Fragen über Rauchbeginn, Anzahl der Zigaretten pro Tag und ob eine Nikotinersatztherapie in Form von Kaugummis, Pflastern und Sublingualtabletten oder eine Therapie mit dem zur Raucherentwöhnung verwendeten Antidepressivum Zyban® begonnen wurde. Bei allen Probanden wurde nach ausführlicher Anamneseerhebung ein kardiovaskuläres Risikoprofil erstellt. Probanden wurden als Hypertoniker definiert, wenn sie eine antihypertensive Therapie oder anamnestisch eine arterielle Hypertonie angaben. Ein Diabetes mellitus wurde als vorliegend gewertet, wenn eine Therapie mit Insulin oder oralen Antidiabetika angegeben wurde. Eine Hyperlipoproteinämie wurde angenommen, wenn eine solche in der Vergangenheit bereits zur Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern oder Cholesterin-Resorptionshemmern geführt hatte oder laborchemisch LDL-Cholesterin-Werte ≥ 160 mg/dl vorlagen. Eine positive Familienanamnese lag vor, wenn männliche oder weibliche Angehörige ersten Grades eine kardiovaskuläre Erkrankung hatten. Weiterhin wurden bereits bestehende kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen aufgenommen.

2.3 Kohlenmonoxidmessung

Die Kohlenmonoxidmessung zeigt an, wie hoch der Kohlenmonoxidgehalt in der endexpiratorischen Atemluft ist. Dieser steht eindeutig in Relation zum Rauchverhalten des Teilnehmers und ist abhängig von der Zahl der gerauchten Zigaretten pro Zeit, Inhalationstiefe und Inhalationsdauer (WALD et al. 1981).

Nach tiefer Inspiration und einer kurzen Atempause von 10 Sekunden erfolgte eine forcierte maximale Expiration in das CO-Messgerät. Für diese Studie wurden zwei Geräte verwendet. Das Gerät 1 (Vitalograph, Hamburg) gibt einen exakten alveolaren CO-Wert in *parts per million* (ppm) bis zu einem Höchstwert an, der direkt mit dem CO-Gehalt des Blutes korreliert. Bei Gerät 2 (Micro Medical, Hamburg) wird die CO-Konzentration der Atemluft in den Schritten von 0-6 ppm, 7-10 ppm, 11-20 ppm und >20 ppm angezeigt. Ein gemessener endexpiratorischer CO-Wert von >6 ppm gilt als die Konzentration eines Rauchers (MIDDLETON und MORICE 2000).

Die CO-Messung erfolgte stets zu Beginn der Kursstunde. Sie diene zusätzlich zur Validierung der Selbstaussage der Teilnehmer. In dieser Studie wurden die CO-Werte zu Beginn und nach 5 Wochen des Raucherentwöhnungsprogramms registriert. Aus technischen Gründen konnte nach 6 Monaten keine Kohlenmonoxidmessung vorgenommen werden, so dass als Hauptkriterium für das Rauchverhalten zu diesem Zeitpunkt die Selbstaussage galt.

2.4 Probenmaterial und Probenlagerung

Die Blutentnahme wurde im Sitzen durch Punktion einer peripheren Vene mittels Einwegkanülen (Butterfly 21 G, Becton Dickinson, Bedford, USA) in Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. Zur Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) wurden Heparinat-Monovetten verwendet. Die Bestimmung von ADMA und des Lipoproteinstatus erfolgte aus Serum-Monovetten. Citrat-Monovetten dienen zur Messung von hsCRP und Fibrinogen, EDTA-Monovetten für die Bestimmung des Blutbildes.

Das Citrat-Plasma wurde direkt nach Abnahme durch 10-minütiges Zentrifugieren (Rotat/S, Hettich, Tuttlingen) bei 3000 U/min vom Blutkuchen getrennt und die Monovette mit einem Phasentrenner versehen. Das Serum wurde aus Vollblut nach Eintritt der Gerinnung bei gleichen Zentrifugeneinstellungen gewonnen. Bis zur Messung, spätestens 12 Stunden nach Abnahme, wurden die Proben bei +5 °C gelagert. Für die Bestimmung der ADMA-Spiegel wurden jeweils 800 µl Serum in Eppendorf-Tubes (Firma Eppendorf, Hamburg) überführt.

Unmittelbar nach Aliquotierung erfolgte das Einfrieren der so vorbehandelten Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das verbleibende Serum in der Monovette wurde bis zur Messung analog zum Citrat-Plasma behandelt.

Für die FACS-Analyse wurde Vollblut aus Heparinat-Monovetten verwendet, da die Proben erst am Morgen des Folgetages verarbeitet wurden, also ebenfalls spätestens nach 12 Stunden, und damit ein besseres Überleben der Zellen gewährleistet werden konnte als bei der Konservierung in EDTA-Monovetten. Die Lagerung der Monovetten bis zur Verarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Es konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Messung am Abend und der Messung am nächsten Morgen bestand (Daten nicht aufgeführt).

2.5 Bestimmung von Lipidstatus, Entzündungswerten und hämatologischen Parametern

Die Bestimmung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen.

Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Reagenzlösungen erfolgte die enzymatische Bestimmung von Gesamtcholesterin (Cholesterol CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim), Triglyzeriden (Triglyceride CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim), HDL-Cholesterin (HDL-C L-Typ, Wako Chemicals, Neuss) und LDL-Cholesterin (LDL-Plus, BioChemica, Flacht) durch einen Autoanalyzers (Roche/Hitachi MODULAR P/D, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Messung des hsCRP wurde durch Agglutination mit Antikörper-beschichteten Latexpartikeln (C-Reaktives Protein (Latex), Roche Diagnostics, Mannheim) turbidimetrisch bei einer Wellenlänge von 552 nm (COBAS INTEGRA 800, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Für die Fibrinogen-Bestimmung fand die Methode nach Clauss Anwendung, wobei Citrat-Plasma mit einem Überschuss an Thrombin (Multifibren U, Dade Behring, Marburg) zur Gerinnung gebracht wird und die Konzentration mit Hilfe eines Gerinnungsmessgerätes (BCS-Analysegerät, Dade Behring, Marburg) ermittelt wird. Die Erstellung des Blutbildes mit einem Differentialblutbild erfolgte aus frischem EDTA-Blut durch automatische Zählung mittels eines Blutbildautomaten (Cell-Dyn 4000, Abbott, Wiesbaden).

2.6 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl an CD 34⁺, VEGFR2⁺ Zellen

2.6.1 Grundlagen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) besteht in der simultanen Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner Zellen in Suspension. Die Zellsuspension wird über eine Stahlkapillare angesaugt, die auf das Zentrum einer Messküvette gerichtet ist. Die Probe wird von einem Hüllstrom erfasst und so stark beschleunigt, dass sich Zellaggregate auftrennen. Dieser Vorgang der „hydrodynamischen Fokussierung“ gewährleistet, dass die Zellen hintereinander aufgereiht einen Laserstrahl einzeln passieren. Beim Passieren kommt es zur Lichtstreuung. Das optische System analysiert dieses Streuverhalten, und es lassen sich Größe und Granularität bestimmen. Dabei korreliert die Vorwärtsstreuung entlang des einfallenden Lichtes (*Forward Light Scatter*, FSC) mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht entsprechend einer Ablenkung im rechten Winkel (*Side Scatter*, SSC) mit der Zellgranularität. Neben der Streuung wird als weiterer Parameter die Fluoreszenz ermittelt. Die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome absorbieren das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht mit einer charakteristischen Wellenlänge. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der markierten Bindungsstellen. Das Fluoreszenzsignal ist umso stärker, je mehr Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome sind das grün fluoreszierende Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) sowie das rot fluoreszierende Phycoerythrin (PE). Kanäle verschiedener Emissionsspektren erlauben dann die Erfassung dieser Fluoreszenzfarbstoffe. Über einen Detektor werden alle Signale empfangen und über einen Analog/Digital-Wandler digitalisiert.

2.6.2 Durchführung

Die FACS erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen.

In jedes Röhrchen wurden 100 µl heparinisieretes Blut pipettiert und mit je 10 µl FITC-konjugiertem anti-humanen CD34-Antikörper (BD Biosciences, San Jose, USA) und PE-konjugiertem anti-humanen VEGF Rezeptor-2 Antikörper (VEGFR2, R&D Systems, Minneapolis, USA) sowie der gleichen Konzentration einer konjugierten Isotypenkontrolle IgG1/FITC (BD Biosciences, San Jose, USA) und IgG1/RPE (DAKO Cytomation) für 15 min

lichtgeschützt bei RT inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Lyse-Reagenz für 10 min die Lyse der Erythrozyten. Nach Abzentrifugieren der Proben bei 1500 U/min für 7 min folgten zwei Waschschrte mit 2 ml CellWash bei gleichen Zentrifugeneinstellungen. Zum Schluss wurde das Zellsediment resuspendiert und mit 0,5 ml 0,5% Paraformaldehyd (PFA, GeReSo, Einbeck) fixiert.

Darauf folgend wurden die Proben im Durchflusszytometer Epics XL (Beckman Coulter, Miami, USA) mit der System II Software V 3.0 analysiert. Die Unterscheidung der Zellen erfolgt nach ihren Eigenschaften im FSC und SSC sowie nach ihren fluoreszierenden Merkmalen. In einer unbehandelten Probe wurde zunächst die Eigenfluoreszenz geprüft und mit der Isotypenkontrolle unspezifische Bindungen ausgeschlossen. Um die charakteristischen Zellpopulationen darzustellen, wurden im FSC und SSC Bereiche (*gates*) eingegrenzt, in denen die Zellen im Fluoreszenzlicht untersucht werden konnten. Die Auswertung erfolgte als Zweiparameter-Darstellung (*dot plot*), aufgeschlüsselt nach den beiden Fluoreszenzfarbstoffen.

2.7 Isolierung und Kultivierung der humanen EPC

2.7.1 Durchführung

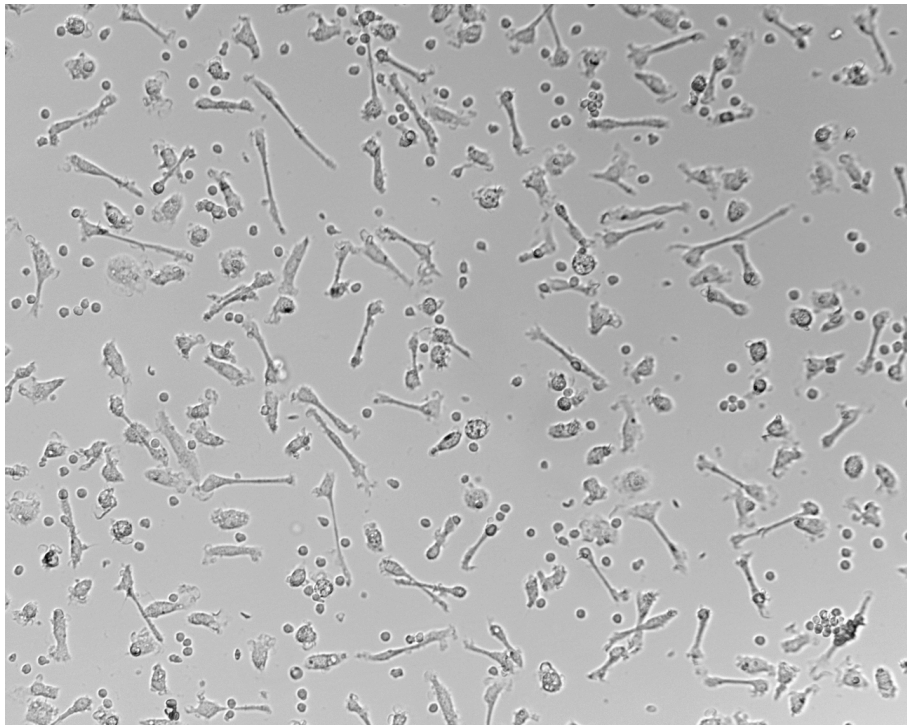
Die Isolierung der MNC erfolgte jeweils im Anschluss an den Raucherentwöhnungskurs oder nach sechsmonatiger Evaluierung direkt bzw. spätestens 12 Stunden nach der Blutentnahme. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei RT durchgeführt.

Unter einer Reinraumwerkbank (CAIRE 5, Clean Air, Hilden) wurden 9 ml heparinisiertes Vollblut mit 9 ml Phosphatpuffer (PBS, GIBCO, Karlsruhe) verdünnt. Zur Separation der MNC von den übrigen Blutbestandteilen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das Gemisch auf 18 ml Dichtegradlösung (Histopaque-1077, Sigma, Taufkirchen) in einem Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) geschichtet und anschließend 30 min lang mit 1800 U/min ohne Bremsfunktion zentrifugiert (Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments, Hanau). Dabei erfolgte die Trennung in die verschiedenen Blutbestandteile: Erythrozyten und Granulozyten aggregierten mit der Polysaccharose des Histopaque und sedimentierten rasch, Lymphozyten und andere MNC zeichneten sich als weißliche Zellschicht (sog. *buffy coat*) ab. Dieser wurde dann mit einer Pasteur-Pipette (WU, Mainz) vorsichtig abgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen in 10 ml

Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV Kit, PromoCell, Heidelberg) versetzt mit 20% fetalem Rinderserum (FCS, Gibco, Karlsruhe), Penicillin (100 U/ml) sowie Streptomycin (100 µg/ml) resuspendiert und anschließend für 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10 ml Kulturmedium behutsam gemischt und bei 900 U/min für weitere 10 min zentrifugiert. Nach diesem Schritt erfolgte nach Absaugen des Überstandes die erneute Resuspension des Zellpellets in 3 ml Zellkulturmedium. Aus dem Zentrifugenröhrchen wurden 100 µl Suspension entnommen und in einem Eppendorf-Tube mit 200 µl Kulturmedium verdünnt. Nach gründlichem Durchmischen wurde dann per automatischer Zählung durch einen Blutbildautomaten (Cell-Dyn 4000, Abbott, Wiesbaden) die Leukozytenzahl bestimmt sowie ein Differentialblutbild der Suspension erstellt. Anhand der Leukozytenanzahl konnte der Verdünnungsfaktor berechnet werden, mit dem die Zellkonzentration für die anschließende Kultivierung eingestellt wurde.

2.7.2 Zellkultivierung

Die isolierten MNC in Suspension wurden in einer definierten Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen in 500 µl Zellkulturmedium auf 24-Well-Fibronektin-beschichteten Kulturschalen (Becton Dickinson, Bedford, USA) ausgesät. Pro Studienteilnehmer wurden 4 Wells (Plattenvertiefungen) befüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (CO₂-Inkubator, Sanyo, Osaka, Japan) bei 37 °C und einem Kohlendioxidanteil von 5% für 7 Tage (vgl. Abb. 1). Nach 4 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Dabei wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Vertiefungen mit 1 ml PBS gewaschen und dann erneut mit 500 µl Zellkulturmedium befüllt.

Abbildung 1: EPC nach 7-tägiger Kultivierung ohne Färbung

2.7.3 Bestimmung von acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen

Unter der Reinraumwerkbank wurde bei RT das Medium in den Wells vorsichtig abgesaugt und acLDL, gekoppelt an das Fluorochrom 1,1'-Dioctadecyltetramethyl-Indocarbocyanine Perchlorate (Dil) (MoBiTec, Göttingen), in einer 1:400 Verdünnung in Kulturmedium mit 400 µl/Well appliziert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 60 min inkubiert. Danach erfolgte ein zweimaliger Waschschriff mit 1 ml PBS. Um die Zellen zu fixieren, wurde 1 ml 2% PFA auf die Vertiefungen pipettiert und für 10 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde zur Markierung der Zellkerne 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma, Taufkirchen) eingesetzt, welches 1:60 in PBS, verdünnt mit 300 µl/Well zugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT im Dunkeln folgten zwei Waschschriffe. Anschließend wurde auf die Zellen mit Fluoreszinisothiocyanat (FITC) konjugiertes Lectin (UEA I, Sigma, Taufkirchen), 1:100 in PBS verdünnt, mit 300 µl/Well aufgetragen. Nach 60-minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurden die Vertiefungen mit 1 ml PBS gewaschen und dann mit 500 µl PBS aufgefüllt, um bei der anschließenden mikroskopischen Auswertung eine Austrocknung zu verhindern. Die Auswertung der Zellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss,

Jena) bei einer 400-fachen Vergrößerung durchgeführt. Durch Betrachtung mittels eines Filters der entsprechenden Wellenlänge kann man die fluoreszierenden Komplexe erkennen.

Die Bilddokumentation erfolgte mittels einer digitalen Kamera (Axio Cam MRm, Carl Zeiss Jena) und dem daran angeschlossenen Bildbearbeitungssystem (Axio Vision 3.1, Carl Zeiss Jena). Folgende Lichtexpositionszeiten wurden für die Aufnahmen gewählt (vgl. Abb. 2-4):

- DAPI 600 ms
- FITC 4000 ms
- Cy3 2000 ms

Für jeden Probanden wurden insgesamt 12 Fotos angefertigt, wobei hier repräsentative Bereiche (in 100-facher Vergrößerung) mit einer hohen Zellkonzentration, gewählt wurden. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert der acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen gebildet.

Abbildung 2: DAPI-Kernfärbung



Abbildung 3: Färbung mit FITC-konjugiertem Lectin

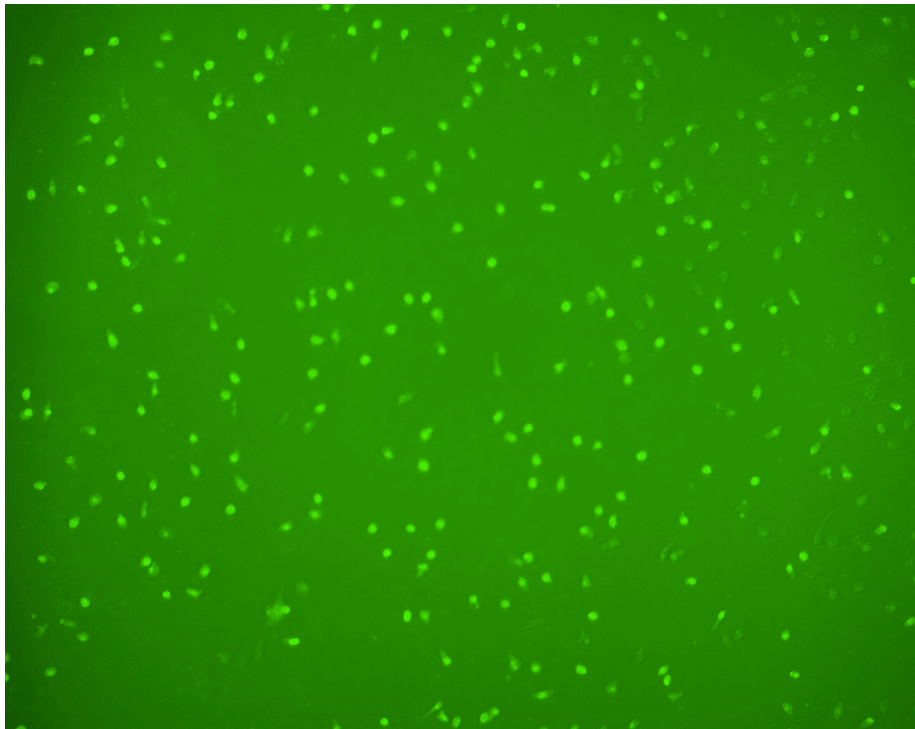


Abbildung 4: Färbung mit Dil-konjugiertem acLDL



2.8 Bestimmung von ADMA im Serum

2.8.1 Grundlagen

Die Messung der ADMA-Konzentrationen erfolgte aus den direkt nach Blutentnahme aliquotierten und dann bei -80 °C eingefrorenen Serumproben nach einmaligem Auftauen. Zur quantitativen Bestimmung von ADMA wurde ein kommerziell erhältlicher kompetitiver Enzymimmunoassay (ADMA-ELISA Kit, DLD Diagnostica, Hamburg) angewandt (Schulze et al. 2004). Dieser ELISA zeichnet sich durch seine hohe Spezifität aus, so dass Kreuzreaktivitäten zu Arginin, Monomethylarginin (NMMA) und symmetrischem Dimethylarginin (SDMA) laut Hersteller als vernachlässigbar zu betrachten sind.

Zunächst erfolgt eine Acylierung des ADMA in der zu untersuchenden Probe, ehe diese auf die ebenfalls mit ADMA beschichtete Mikrotiterplatte gegeben wird. Dann wird ein Antiserum mit hochspezifisch gegen ADMA gerichteten Antikörpern zugesetzt, so dass das nachzuweisende ADMA aus Patientenserum mit dem an die Festphase gekoppelten ADMA um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht an die Mikrotiterplatte gebundene Antigen-Antikörper-Komplex durch Waschen entfernt und durch Applizieren eines an eine Peroxidase (POD) gekoppelten Enzymkonjugats, spezifisch gegen den anti-ADMA-Antikörper, der an die Platte gebundene Komplex nachgewiesen. Die Peroxidase setzt einen hinzugefügten Farbstoff, hier Tetramethylbenzidin (TMB), um, so dass über den Umsatz der gebundene Komplex nachgewiesen werden kann. Durch Hinzufügen von Schwefelsäure wird die TMB/POD-Reaktion gestoppt, es folgt ein Farbumschlag von blau zu gelb, und über ein Photometer kann die Absorption gemessen werden. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes und somit die Farbintensität ist folglich umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Serumprobe.

2.8.2 Durchführung

Im ersten Schritt erfolgte die Probenvorbereitung (Acylierung). Zunächst wurden jeweils $20\text{ }\mu\text{l}$ von insgesamt 6 Standardreagenzien in definierten Konzentrationen auf die Reaktionsplatte appliziert. Mit den Werten der Standards ließ sich später eine Eichkurve ermitteln, anhand derer die Konzentrationen der Kontrollen und der Patientenproben abgelesen werden konnten. In die weiteren Wells wurden zwei Kontrollreagenzien und

jeweils 20 µl Probandenprobe pipettiert. Danach wurden 25 µl Acylierungspuffer und 25 µl Ausgleichsreagenz hinzugegeben und vorsichtig für 10 sec gemischt. Im Weiteren wurden 25 µl Acylierungsreagenz pipettiert und die Platte für 30 min auf einem Horizontalschüttler (Stuart SSL4, Barloworld, Staffordshire, UK) bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Ausgleichsreagenz erfolgte erneut eine 45-minütige Inkubation auf dem Schüttler.

Die vorbehandelten Proben wurden dann im zweiten Schritt in einem kompetitiven ELISA eingesetzt. Dafür wurden 50 µl der vorbereiteten Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen appliziert und mit 50 µl Antiserum versetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Schüttler wurde die Platte mit Folie abgedeckt und über Nacht für 15-20 Stunden bei 5 °C inkubiert. Anschließend erfolgten 4 Waschschritte mit 250 µl Waschpuffer, um freie Antigen-Antikörper-Komplexe zu entfernen. Nach dem Waschen wurden 100 µl Enzymkonjugat in jede Vertiefung gegeben, nach 60-minütiger Inkubation bei RT wurden die Mikrotiterstreifen viermal gewaschen. Danach wurden 100 µl TMB-Lösung in die Wells pipettiert, bei RT unter Schütteln für 30 min inkubiert und die Reaktion durch Hinzugeben von 100 µl Schwefelsäure in gleicher Reihenfolge und gleichem Zeitakt wie die Substrat-Inkubation gestoppt. Nach dem Stoppen wurden die Streifen bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 610 nm im Mikrotiterplattenphotometer (KC4, Bio-Tek instruments, Vermont, USA) gemessen. Für die Auswertung (Kineticalc Version 2.6, Bio-Tek instruments, Vermont, USA) wurden die optische Dichte der Standards (linear) gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen, und die Eichkurve zur Konzentrationsbestimmung gebildet.

2.9 Statistik

Die Analyse der Daten und deren grafische Darstellung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Die Analyse abhängiger Stichproben erfolgte durch den gepaarten t-Test oder den Wilcoxon-Rangsummentest. Für unabhängige Stichproben wurde der ungepaarte t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Subgruppenanalysen erfolgten mittels der Varianzanalyse (ANOVA) oder des Kruskal-Wallis-Tests. Bei Normalverteilung wurden die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt, kontinuierliche Variablen ohne Normalverteilung wurden als Median mit den entsprechenden 25. und 75. Perzentilen angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Initial wurden 115 Teilnehmer des Tabakentwöhnungsprogrammes zu Beginn ihres Kurses im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht. Nach Beendigung des fünfwöchigen Tabakentwöhnungskurses konnten 79 Teilnehmer reevaluiert werden, von denen 67 die Einschlusskriterien erfüllten und letztlich in die Studie aufgenommen wurden. Gründe dafür, dass Probanden nicht wieder evaluiert werden konnten, waren der Abbruch des Entwöhnungskurses bzw. die fehlende Anwesenheit am letzten Kurstermin. Tabelle 1 zeigt die basisdemographischen Charakteristika dieser 67 Patienten. Die Mehrheit der Probanden waren Frauen (62,7%). Es fand sich ein mittlerer Body-Mass Index (BMI) von $24,7 \pm 3,9 \text{ kg/m}^2$. Das Durchschnittsalter lag bei $46,9 \pm 11,0$ Jahren.

Im Mittel wurde das Rauchen mit $17,1 \pm 5,0$ Jahren begonnen und eine geschätzte Rauchdosis von $30,3 \pm 15,7$ Packungsjahren konsumiert. Der tägliche Tabakkonsum betrug vor Entwöhnung $19,9 \pm 7,3$ Zigaretten. Nach Beendigung des Kurses war eine hoch signifikante Reduktion auf $0 \pm 0,1$ Zigaretten pro Tag zu verzeichnen ($p < 0,0001$), wobei 66 Teilnehmer (98,5%) komplett rauchfrei waren. Ein Teilnehmer gab an, noch eine Zigarette am Tag zu rauchen; dieser Proband konnte bei einem CO-Gehalt von 1 ppm in die Studie eingeschlossen werden. Bei Kursende gaben 45 Studienteilnehmer (67,2%) eine Therapie mit Nikotinersatzprodukten an. Das die Entwöhnung unterstützende Antidepressivum Zyban® wurde von 5 Probanden (7,5%) eingenommen. Die oben im Text genannten Daten und weitere Informationen sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

Nach 6 Monaten wurden alle bereits eingeschlossenen Teilnehmer telefonisch kontaktiert, von denen 24 ehemalige Raucher sich nochmals freiwillig vorstellten. In diesem Kollektiv hatten 9 wieder mit dem Rauchen begonnen. Die komplett rauchfreien 15 Probanden, 6 Frauen und 9 Männer, mit einem mittleren Alter von $51,7 \pm 12,5$ Jahren, wurden erneut evaluiert. Eine unterstützende Nikotinersatztherapie wurde von 8 Teilnehmern angegeben, die diese im Mittel über eine Dauer von $65,6 \pm 51,2$ Tagen nutzten. Das Entwöhnungsmittel Zyban® wurde von 2 Probanden (12,5%) eingenommen, wobei die mittlere Einnahmezeit nicht erfasst wurde. Statistisch hoch signifikant war eine Erhöhung des BMI von $24,7 \pm 4,1 \text{ kg/m}^2$ auf $25,7 \pm 4,6 \text{ kg/m}^2$ ($p = 0,0009$). Zum Erfassungszeitpunkt lag keine Änderung hinsichtlich neuer kardiovaskulärer Erkrankungen oder deren Therapie bei vorbestehender Disposition vor.

Tabelle 1: Probandencharakteristika

Geschlecht, <i>n</i> weiblich / <i>n</i> männlich	42 / 25
Alter, in Jahren	46,9 ± 11,0
BMI, kg/m²	24,7 ± 3,9
Zigaretten pro Tag, <i>n</i>	19,9 ± 7,3
Alter zu Beginn des Tabakkonsums, in Jahren	17,1 ± 5,0
Packungsjahre, in Jahren	30,3 ± 15,7
CO-Konzentration in der Ausatemluft, ppm	18,1 ± 10,6
Nikotinersatztherapie, <i>n</i> (%)	45 (67,2)
Einnahme von Zyban®, <i>n</i> (%)	5 (7,5)
Zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren, <i>n</i> (%)	34 (50,7)
• Arterieller Hypertonus, <i>n</i> (%)	15 (22,4)
• Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	3 (4,5)
• Hypercholesterinämie, <i>n</i> (%)	26 (38,8)
Vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankungen, <i>n</i> (%)	7 (10,4)
• Koronare Herzkrankheit, <i>n</i> (%)	4 (6,0)
• Schlaganfall, <i>n</i> (%)	4 (6,0)
• Peripher-arterielle Verschlusskrankheit, <i>n</i> (%)	5 (7,5)
Medikation, <i>n</i> (%)	15 (22,4)
• Aspirin, <i>n</i> (%)	5 (7,5)
• Statine, <i>n</i> (%)	5 (7,5)
• ACE Hemmer / AT1 Blocker, <i>n</i> (%)	6 (9,0)
• Betablocker, <i>n</i> (%)	10 (14,9)

Angaben für kontinuierliche Variablen (z.B. Alter, Zigaretten pro Tag) als Mittelwerte ± SD, für kategoriale Variablen (z.B. Geschlecht, Risikofaktoren) als Anzahl *n* sowie prozentualer Anteil.

Hinsichtlich zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktoren gaben 15 Personen (22,4%) einen arteriellen Hypertonus an, bei 3 Personen (4,5%) lag ein Diabetes mellitus und bei 26 (38,8%) eine Hypercholesterinämie vor. Diese Risikofaktoren traten auch kombiniert auf. Von den Probanden mit kardiovaskulärem Risikoprofil litten 4 (5,6%) an einer KHK mit pektanginösen Beschwerden oder hatten bereits einen Myokardinfarkt erlitten. Weiterhin wurde bei 5 Teilnehmern (7,5%) eine pAVK diagnostiziert, und 4 Studienteilnehmer (6,0%) hatten bereits einen zerebralen Insult oder eine transitorische ischämische Attacke durchgemacht. Eine kardiovaskuläre Medikation wurde von 15 Probanden (22,4%) regelmäßig eingenommen.

Die Probanden wurden in Subgruppen unterteilt und somit untersucht, ob Unterschiede bezüglich des Geschlechts, der täglichen Rauchdosis, einer Einnahme von Nikotinersatzprodukten sowie weiterer kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen außer dem Rauchen bestehen. Aufgrund der geringen Zahl an erfassten Teilnehmern nach 6 Monaten erfolgte die Gruppeneinteilung lediglich für den Vergleich vor Nikotinentwöhnung und 5 Wochen nach Beendigung des Programms. Die vorliegende Arbeit richtete den Fokus dabei auf den Vergleich von „gesunden Rauchern“ und „Rauchern mit weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen“. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengefasst. Keine statistischen Unterschiede gab es in diesen Subgruppen bezüglich der Geschlechterverteilung sowie dem aktuellem Rauchverhalten und der damit verbundenen CO-Konzentration in der Ausatemluft. Allerdings zeigte sich in der „Risikogruppe“ ein höheres mittleres Alter ($p=0,0003$) und ein erhöhter BMI ($p=0,0066$) sowie ein stärkeres Rauchverhalten gemessen in Packungsjahren ($p=0,027$). Des Weiteren nutzten die Probanden in dieser Gruppe häufiger Nikotinersatzprodukte ($p=0,03$) als die „gesunden Probanden“.

Tabelle 2: Epidemiologischer Gruppenvergleich

	Gesunde Probanden (n=33)	Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen (n=34)	<i>p</i>
Geschlecht , weiblich / männlich	24/9	18/16	0,097
Alter , Jahre	42,2 ± 10,3	51,6 ± 9,7	0,0003
BMI , kg/m ²	23,3 ± 2,5	26,0 ± 4,6	0,007
Zigaretten pro Tag , <i>n</i>	20,4 ± 8,8	19,5 ± 5,7	0,61
Alter zu Beginn des Tabakkonsums , Jahre	17,4 ± 6,3	16,8 ± 3,3	0,63
Packungsjahre , Jahre	27,1 ± 18,7	33,3 ± 11,6	0,027
CO Konzentration in der Ausatemluft , ppm	19,3 ± 10,3	16,7 ± 10,9	0,43
Nikotinersatztherapie , <i>n</i> (%)	18 (54,5)	27 (79,4)	0,03

Angaben für kontinuierliche Variablen (z.B. Alter, Zigaretten pro Tag) als Mittelwerte ± SD, für kategoriale Variablen (z.B. Geschlecht, Risikofaktoren) als Anzahl ‚n‘ sowie prozentualer Anteil. Statistisch signifikante Unterschiede wurden „fett“ markiert.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Probanden aus den vorliegenden Analysen

	Gesamt- kollektiv	VEGFR2 ⁺ , CD34 ⁺ Zellen	ADMA	Lipoproteine	hsCRP	Fibrinogen	<i>p</i>
Anzahl, <i>n</i>	67	61	59	66	56	58	
Geschlecht, % Frauen	62,7	63,9	61,0	62,1	60,7	65,5	>0,99
Alter, Jahre	46,9±11,0	45,3±10,3	46,5±11,1	47,0±11,1	46,8±11,6	46,0±10,3	0,98
BMI, kg/m²	24,7±3,9	24,8±4,0	24,8±4,1	24,7±4,0	24,6±4,2	24,7±3,8	0,99
Zigaretten pro Tag, <i>n</i>	19,9±7,3	19,8±7,5	19,7±7,4	20,0±7,3	20,2±7,7	20,0±7,4	0,99
Alter zu Beginn des Tabakkonsums, Jahre	16,8±4,4	16,6±5,4	17,0±4,9	15,8±2,8	16,2±3,5	15,3±1,6	0,99
Packungsjahre, Jahre	30,3±15,7	31,0±15,6	29,7±15,6	30,4±15,8	30,6±16,3	29,6±15,3	0,99
CO Konzentration in der Ausatemluft, ppm	18,1±10,6	17,9±9,7	18,2±10,8	18,4±10,4	18,9±10,9	17,7±10,9	0,99
Nikotinersatztherapie, %	67,2	67,2	69,5	68,2	67,9	69,0	0,99
Weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen, %	50,7	49,2	47,5	51,5	48,2	46,6	0,99
Kardiovaskuläre Medikation, %	22,4	21,3	23,7	22,7	25,0	22,4	0,99

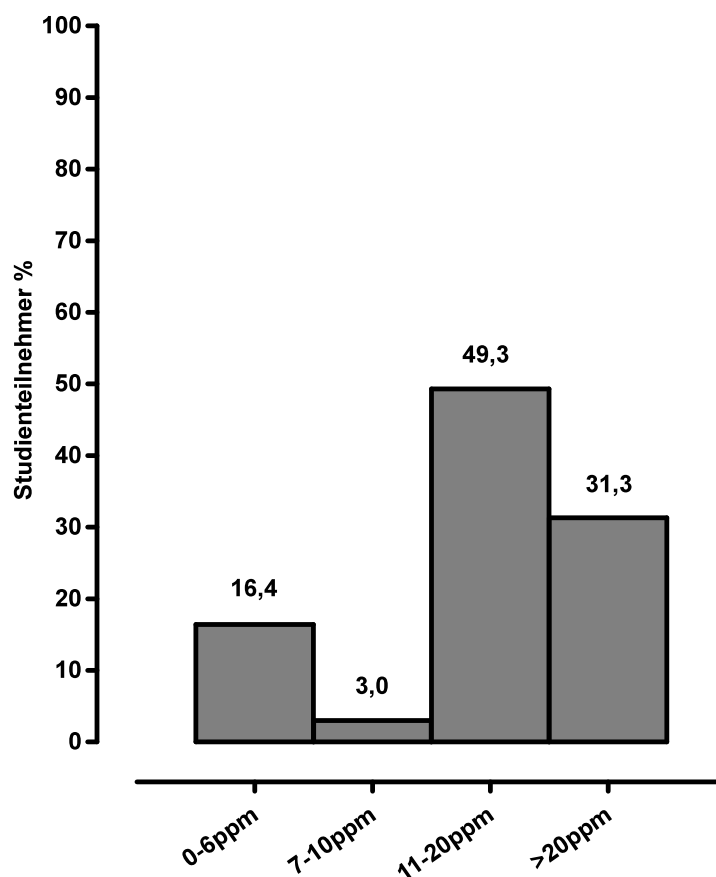
Angaben für kontinuierliche Variablen (z.B. Alter, Zigaretten pro Tag) als Mittelwerte ± SD, für kategoriale Variablen (z.B. Geschlecht, Risikofaktoren) als Anzahl ‚n‘ bzw. prozentualer Anteil.

Nicht jede Analyse war bei allen 67 Probanden durchführbar. Deshalb wurden die Probanden für die Versuche randomisiert und ohne vorherige Selektion aufgeteilt. Die Tabelle 3 zeigt die klinischen Charakteristika der Probanden für die jeweils durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zu denen des Gesamtkollektives. Es konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in den Subgruppen im Vergleich zum Gesamtkollektiv bestanden.

3.2 Kohlenmonoxidmessung

Die Messung der CO-Konzentration in der Ausatemluft diente der zusätzlichen Validierung der Aussagen zum Rauchverhalten.

Abbildung 5: Validierung des Rauchverhaltens durch expiratorische CO-Messung

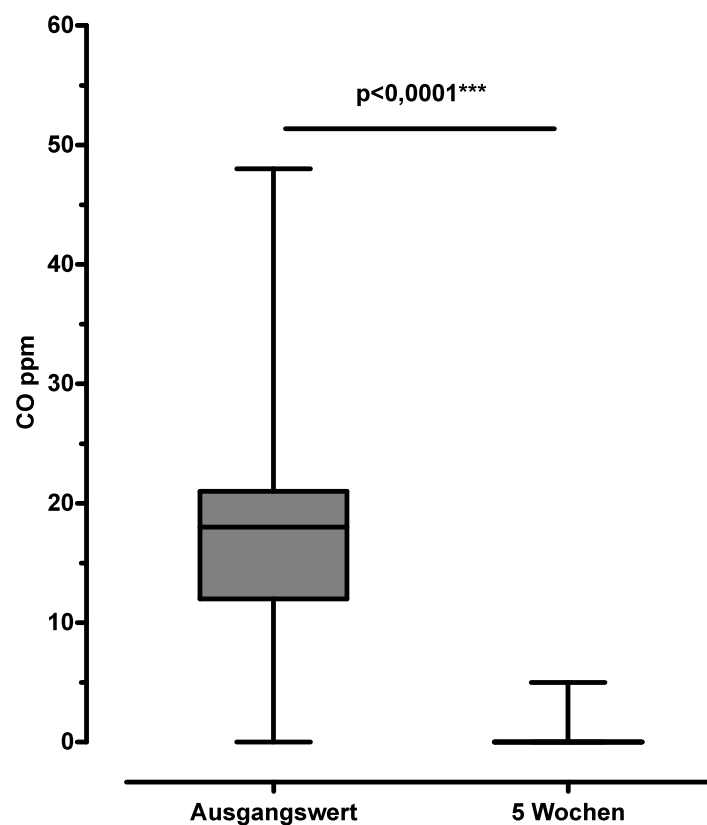


Einteilung der gemessenen CO-Werte in 4 Stufen vor Raucherentwöhnung.

Die Abbildung 5 zeigt die prozentuale Verteilung der Probanden in 4 Gruppen (0-6 ppm, 7-10 ppm, 11-20 ppm und mehr als 20 ppm) zu Beginn des Programms. Nach fünfwöchiger Nikotinabstinenz wurden nur Teilnehmer mit CO-Werten bis zu 6 ppm eingeschlossen.

Bei 51 Teilnehmern konnten exakte CO-Werte mit Hilfe des Vitalograph gemessen werden. Hier war im direkten Vergleich eine statistisch hoch signifikante Reduktion des Kohlenmonoxidgehaltes von anfangs $18,1 \pm 10,6$ ppm auf $0,3 \pm 0,9$ ppm nach fünfwöchiger Nikotinkarenz in der Ausatemluft zu detektieren ($p < 0,0001$). Zu Beginn des Kurses korrelierte die Zigarettenanzahl positiv mit dem endexpiratorischen CO-Gehalt ($n=51$; $R^2=0,1$; $p=0,02$) (vgl. Abb. 6).

Abbildung 6: Messung des exakten expiratorischen CO-Gehalts

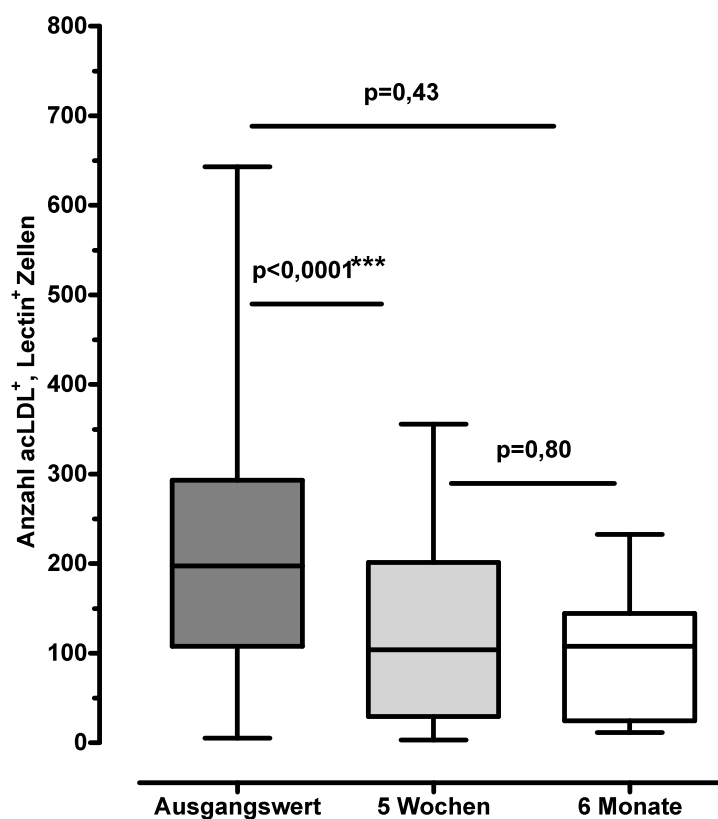


3.3 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die Anzahl kultivierbarer acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen

3.3.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs

Die mittlere Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen der 67 Studienteilnehmer betrug zu Beginn des Raucherentwöhnungsprogramms $214,2 \pm 142,6$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen, während nach 5 Wochen nur noch $126,6 \pm 110,3$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen gefunden wurden. Diese Reduktion war statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Bei Betrachtung der nach 6 Monaten eingeschlossenen 15 Probanden wurde eine mittlere Zellzahl von $100,9 \pm 71,8$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen und somit keine weitere statistisch signifikante Änderung detektiert ($p = 0,43$) (vgl. Abb.7).

Abbildung 7: Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen im Gesamtkollektiv

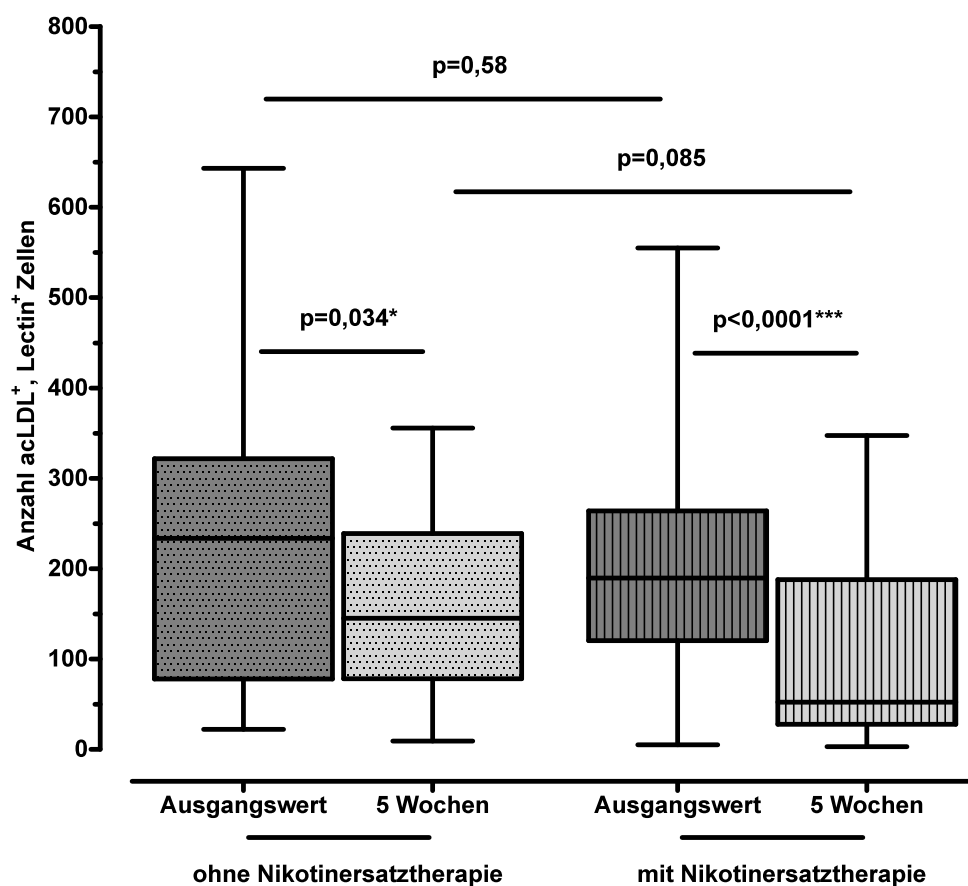


3.3.2 Subgruppenvergleiche

Einfluss einer Nikotinersatztherapie

Um zu klären, ob eine Nikotinersatztherapie Auswirkungen auf die Anzahl der acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen hat, wurden zwei Subgruppen gebildet. Sowohl in der „Gruppe der Probanden ohne Nikotinersatztherapie“ (n=22; 231,0 ± 170,3 vs. 157,0 ± 105,0 Zellen; p=0,033) als auch in der „Gruppe der Probanden mit Nikotinersatztherapie“ (n=45; 206,0 ± 128,2 vs. 111,7 ± 110,8 Zellen; p<0,0001) konnte eine signifikante Reduktion der acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen nach fünfwöchiger Entwöhnung beobachtet werden. Beim Vergleich beider Subgruppen zeigten sich keine Unterschiede (Ausgangswert p=0,58; 5 Wochen p=0,085) (vgl. Abb. 8).

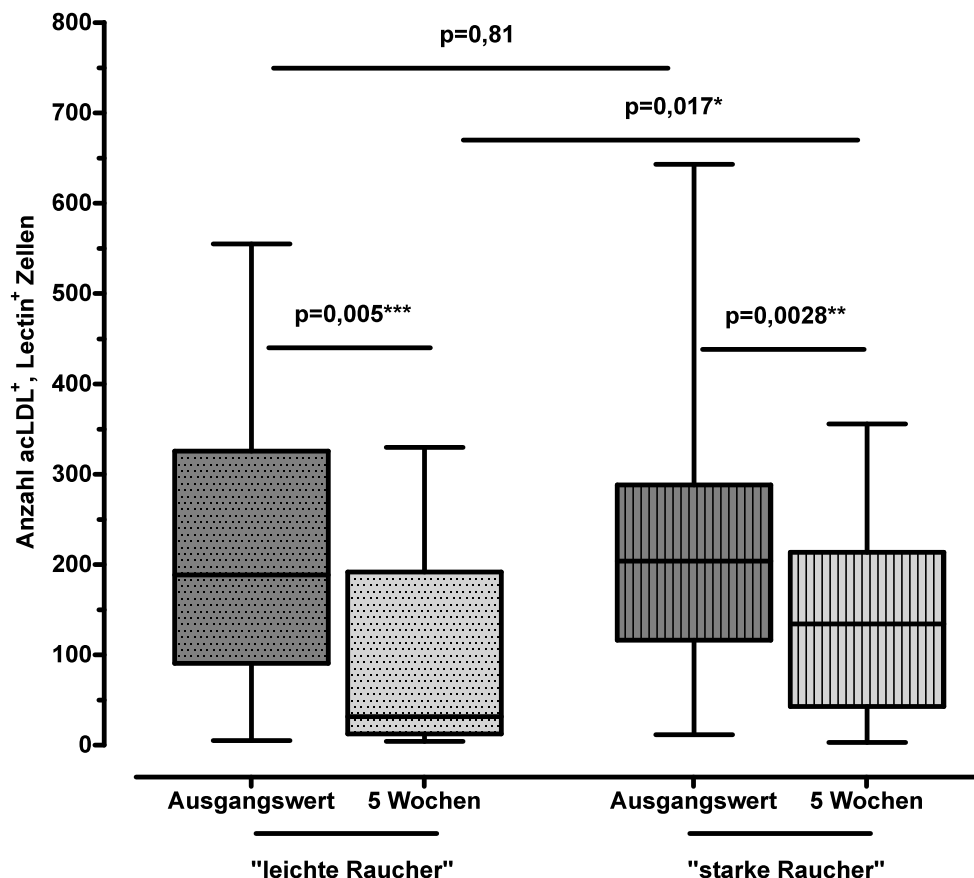
Abbildung 8: Vergleich der Probanden ohne und mit Nikotinersatztherapie



Einfluss der konsumierten Tabakdosis

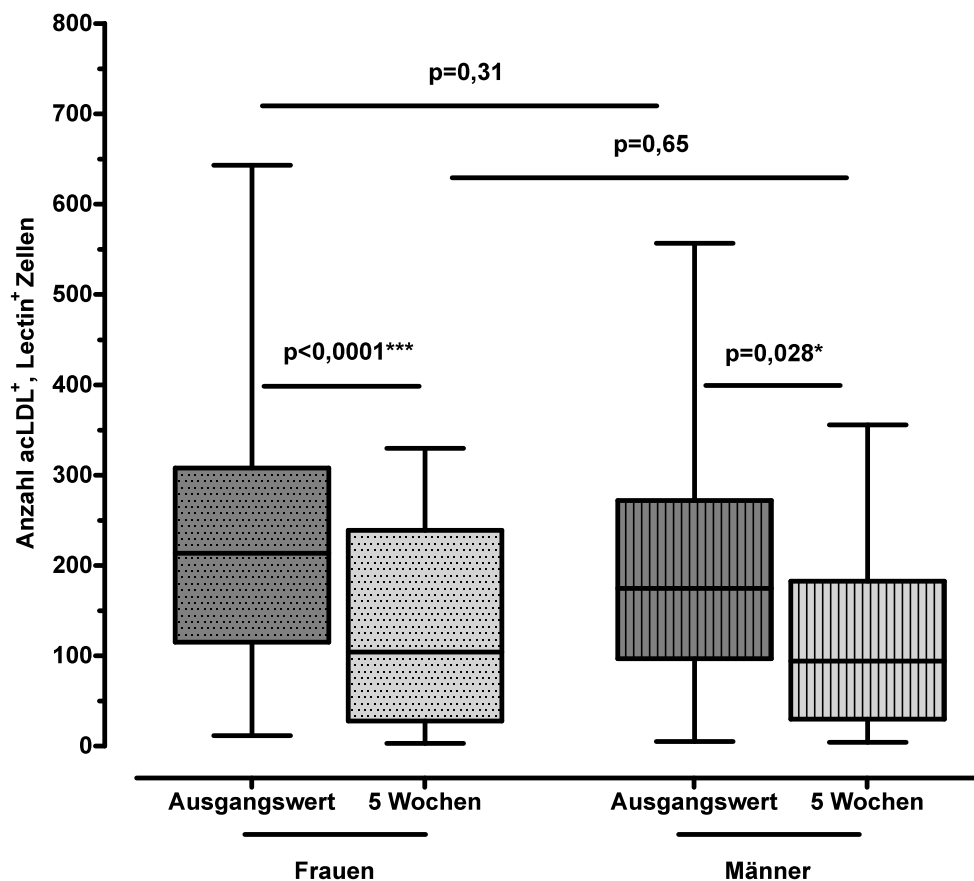
Eine weitere Einteilung erfolgte anhand der täglichen Rauchdosis in „leichte“ (<20 Zigaretten pro Tag, n=27) und „starke“ Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag, n=40). Nach 5 Wochen konnte eine signifikante Reduktion an acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen in beiden Gruppen detektiert werden („leichte“ Raucher: $221,4 \pm 147,7$ vs. $94,7 \pm 103,6$ Zellen; p=0,0005; „starke“ Raucher: $216,0 \pm 140,9$ vs. $148,2 \pm 110,6$ Zellen; p=0,0028). Im Subgruppenvergleich der Ausgangswerte gab es statistisch keinen Unterschied (p=0,81), während zum Kursende ehemalige „starke“ Raucher signifikant mehr acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen aufwiesen (p=0,017) (vgl. Abb. 9).

Abbildung 9: Vergleich „leichte“ und „starke“ Raucher



Einfluss des Geschlechtes

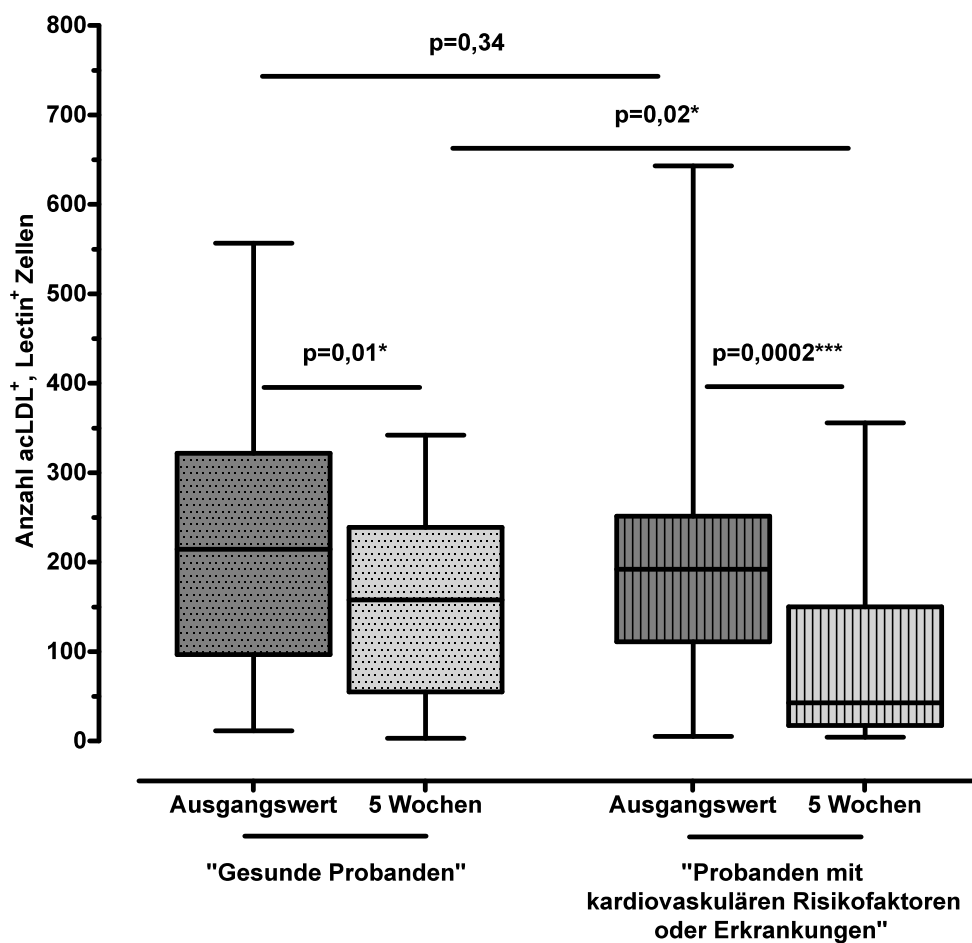
Um geschlechtsspezifische Einflüsse einer Tabakentwöhnung auf die Zahl kultivierbarer acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen zu prüfen, wurden Frauen und Männern miteinander verglichen. Nach Rauchstopp konnten sowohl bei Frauen (n=43; 224,5 ± 141,9 vs. 132,9 ± 111,2 Zellen; p<0,0001) als auch bei den Männern (n=25; 196,7 ± 145,0 vs. 116,0 ± 110,0 Zellen; p=0,028) deutlich weniger acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen kultiviert werden. Beide Gruppen unterschieden sich weder vor Entwöhnung (p=0,31) noch nach 5 Wochen (p=0,65) signifikant voneinander (vgl. Abb. 10).

Abbildung 10: Vergleich Frauen und Männer

Einfluss des zusätzlichen Vorhandenseins eines kardiovaskulären Risikos

Da ungefähr die Hälfte der Studienteilnehmer neben Rauchen noch weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie Erkrankungen angab, erfolgte eine weitere Einteilung in „gesunde Probanden“ und „Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankung“. In der Gruppe der gesunden Studienteilnehmer (n=33) wurde vor Entwöhnung eine mittlere Anzahl von $229,8 \pm 144,1$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen verzeichnet. Die Entwöhnung resultierte in einer signifikanten Reduktion dieser Zellen im Mittel auf $157,1 \pm 105,8$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen ($p=0,01$) gefunden. Ein ähnlich deutliches Ergebnis war auch in der Gruppe der „Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen“ zu vermerken.

Abbildung 11: Vergleich der Probanden ohne und mit Risikoprofil



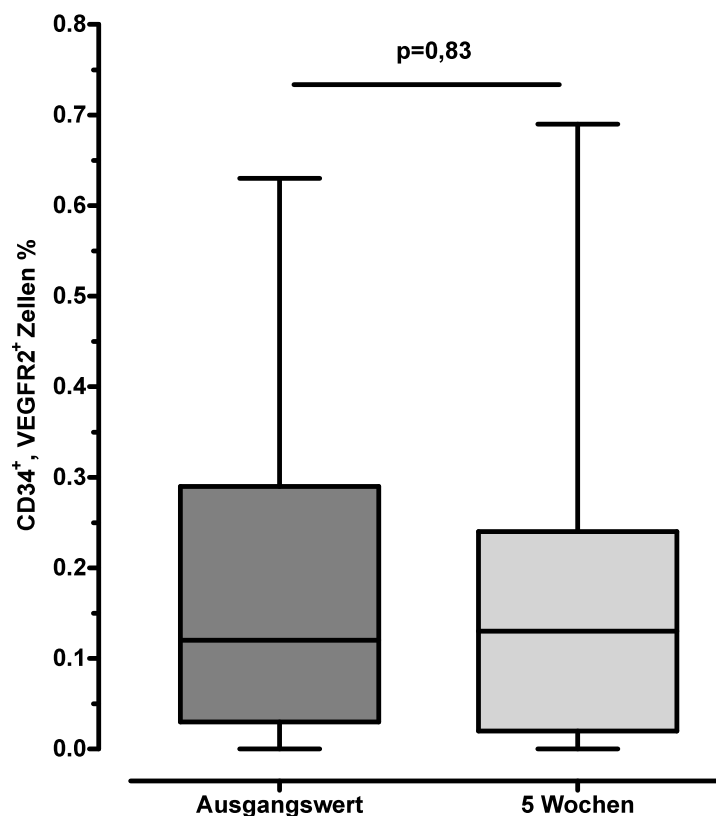
Ausgehend von einer mittleren Zellzahl von $199,0 \pm 141,6$ acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen zu Beginn des Kurses konnten nach Nikotinentwöhnung signifikant weniger Zellen kultiviert werden ($97,0 \pm 107,8$ Zellen; $p=0,0002$). Zu Kursbeginn unterschieden sich beide Gruppen nicht ($p=0,34$). Dagegen zeigten die Probanden mit Risikoprofil nach 5 Wochen deutlich weniger acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen als die „gesunden Probanden“ ($p=0,02$) (vgl. Abb. 11).

3.4 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die mittels Durchflusszytometrie im peripheren Blut detektierbare Anzahl an CD 34⁺, VEGFR2⁺ Zellen

3.4.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs

Zu Beginn des Raucherentwöhnungsprogramms lag der prozentuale Mittelwert der CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen bei $0,18 \pm 0,17\%$. Nach Rauchstopp konnte keine signifikante Änderung der Zellzahl detektiert werden ($n=61$; $0,18 \pm 0,19\%$; $p=0,83$) (vgl. Abb. 12).

Abbildung 12: Anzahl zirkulierender CD 34⁺, VEGFR2⁺ Zellen im Gesamtkollektiv



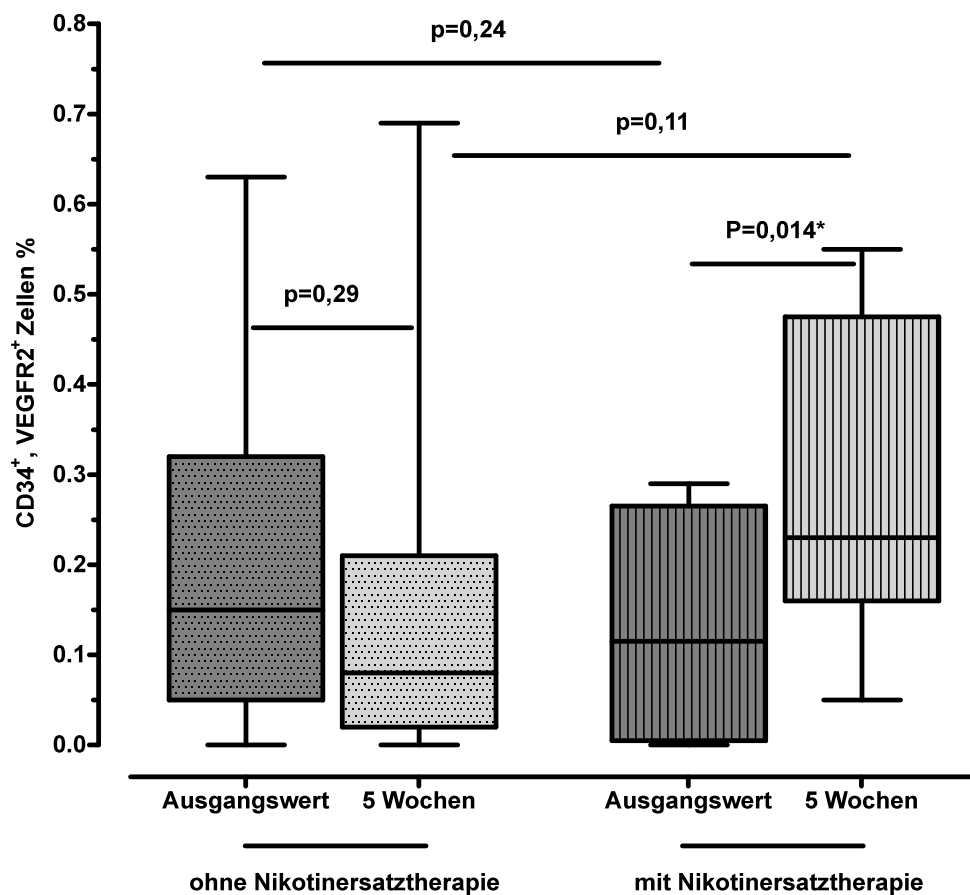
3.4.2 Subgruppenvergleiche

In den Subgruppenanalysen bezüglich Frauen und Männer sowie der Rauchdosis konnten keine Unterschiede in der Anzahl der CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen detektiert werden (Daten nicht aufgeführt).

Einfluss einer Nikotinersatztherapie

Der Vergleich der Probanden ohne und mit Nikotinersatztherapie zeigte, dass nach Entwöhnung signifikant mehr Zellen während der Einnahme von Nikotinersatzprodukten vorhanden waren (ohne Nikotinersatz $0,15 \pm 0,18\%$ vs. mit Nikotinersatz $0,29 \pm 0,17\%$; $p=0,014$) (vgl. Abb.13).

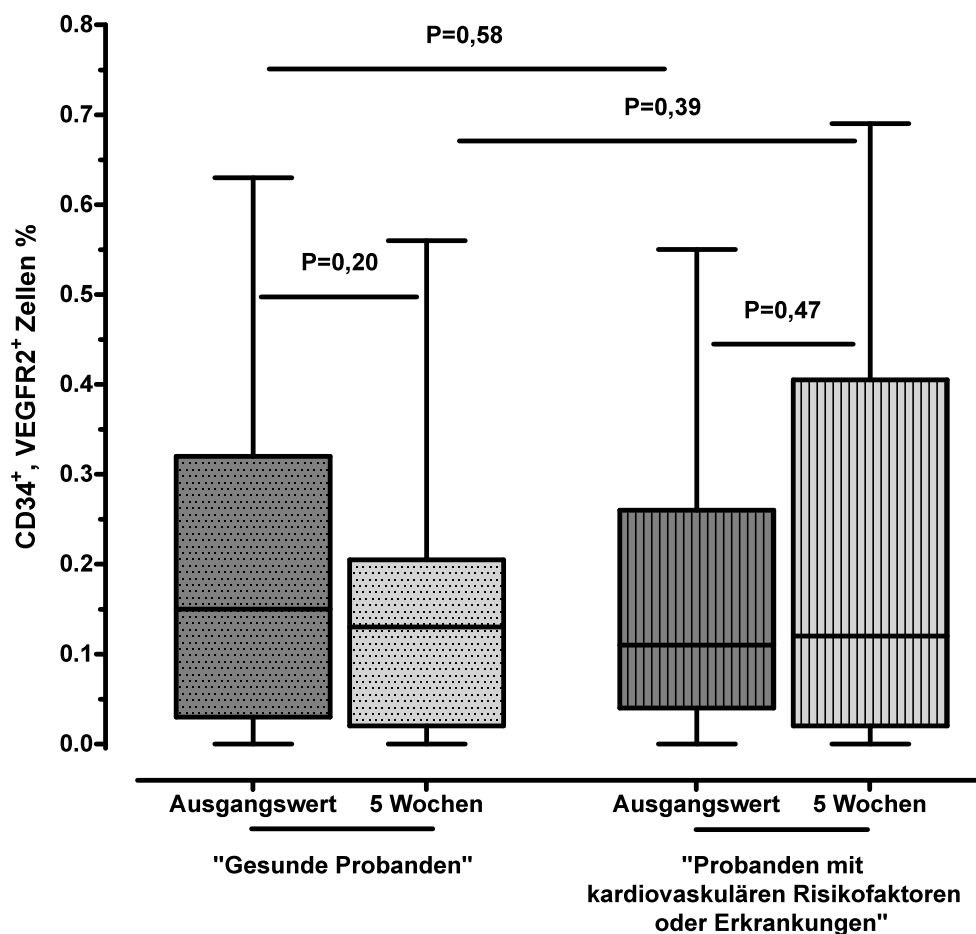
Abbildung 13: Vergleich der Probanden ohne und mit Nikotinersatztherapie



Einfluss des zusätzlichen Vorhandenseins eines kardiovaskulären Risikos

Die Subgruppenanalyse hinsichtlich des Risikoprofils zeigte in der Anzahl der CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen weder in der Gruppe der „gesunden Probanden“ (n=29; Ausgangswert 0,19 ± 0,17% vs. 5 Wochen 0,14 ± 0,13%; p=0,20) noch in der Gruppe der „Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen“ (n=32; Ausgangswert 0,17 ± 0,16% vs. 5 Wochen 0,21 ± 0,22%; p=0,47) signifikante Unterschiede. Weiterhin unterschieden sich die gemessenen Zellzahlen in beiden Gruppen weder zu Beginn der Raucherentwöhnung (p=0,58) noch am Ende des Kurses (p=0,39) (vgl. Abb. 14).

Abbildung 14: Vergleich der Probanden ohne und mit Risikoprofil

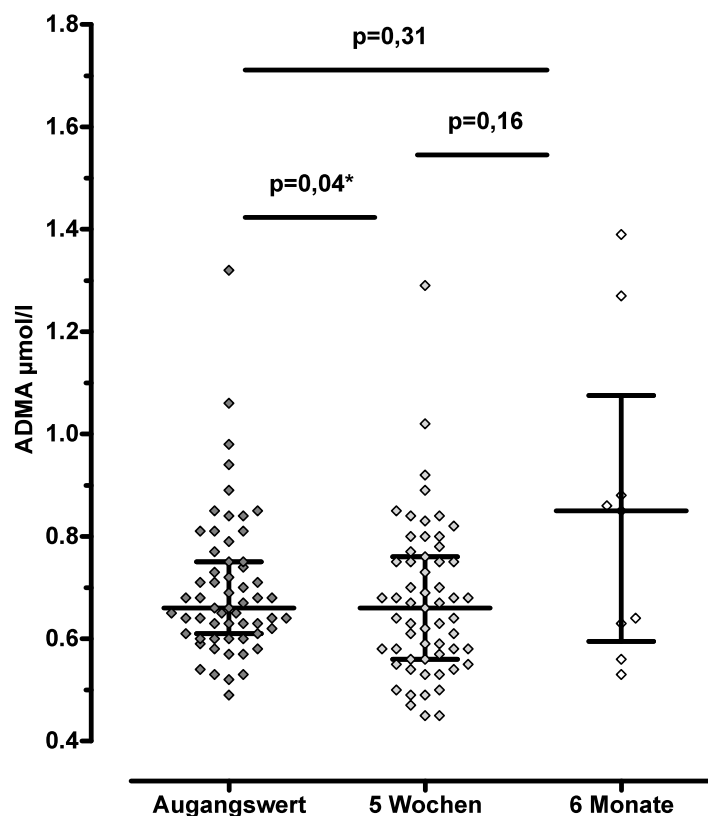


3.5 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf die ADMA-Serumkonzentration

3.5.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs

Vor Nikotinentwöhnung zeigten die Studienteilnehmer eine mediane ADMA-Konzentration im Serum von 0,66 [0,61; 0,75] $\mu\text{mol/l}$ (n=59) (Abb. 11). Nach 5 Wochen konnte eine signifikante Reduktion der medianen ADMA-Konzentrationen auf 0,66 [0,56; 0,76] $\mu\text{mol/l}$ (n=59; p=0,040 nach Testung mittels Wilcoxon-Rangsummentest für gepaarte Stichproben) nachgewiesen werden. Die Analyse der evaluierten Studienteilnehmer nach 6 Monaten wies keinen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert auf, hier lag die ADMA-Serumkonzentration bei 0,85 [0,60; 1,08] $\mu\text{mol/l}$ (n=9; p=0,31) (vgl. Abb. 15).

Abbildung 15: Serumkonzentration von ADMA im Gesamtkollektiv



3.5.2 Subgruppenvergleiche

Auf weitere Subgruppenanalysen wurde verzichtet, da die ADMA-Konzentrationen im Gesamtkollektiv bereits nur schwach signifikante Unterschiede zeigten.

3.6 Auswirkungen einer Tabakentwöhnung auf weitere Biomarker eines erhöhten kardiovaskulären Risikos

Tabelle 4 zeigt die Konzentrationen von Biomarkern eines erhöhten kardiovaskulären Risikos im Gesamtkollektiv zu den Zeitpunkten „Kursbeginn“, „Kursende“ sowie „6 Monate später“. Bezüglich des Lipidstatus konnte nach 5 Wochen gezeigt werden, dass insbesondere das LDL-Cholesterin signifikant durch Rauchabstinenz abfiel ($p=0,002$). Die Konzentration des HDL-Cholesterins war statistisch nicht signifikant verändert, bei der Betrachtung des LDL/HDL-Quotienten konnte aber nach Raucherentwöhnung, zumindest nach 5 Wochen, ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden ($p<0,006$). Während die Konzentration des Akutphaseproteins Fibrinogen im Plasma sowohl bei Kursende ($p=0,008$) als auch nach wiederholter Evaluation nach 6 Monaten ($p=0,195$) deutlich unter denen der Ausgangswerte lag, konnte solch ein Konzentrationsabfall für hsCRP nicht nachgewiesen werden.

Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentrationen der Risikomarker für die Atherosklerose insbesondere in der Gruppe der „Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen“ höher lagen verglichen mit denen der „gesunden Probanden“ (vgl. Tabelle 5). Alle Ergebnisse waren, mit Ausnahme der HDL-Konzentration, nach Nikotinstopp statistisch signifikant verändert, letztere spiegelte sich jedoch in einem signifikant höheren Quotienten aus LDL- und HDL-Cholesterin in der Risikogruppe in beiden Beobachtungszeiträumen wider.

Tabelle 4: Laborparameter im Gesamtkollektiv

	Ausgangswert	Nach 5 Wochen	<i>p</i> ₁	Nach 6 Monaten	<i>p</i> ₂
Gesamt-Cholesterin, mg/dl	218 [185; 243]	209 [176; 244]	0,65	198 [180; 242]	1,0
LDL-Cholesterin, mg/dl	140 [109;165]	125 [104; 151]	<0,003	118 [103;159]	0,41
HDL-Cholesterin, mg/dl	57 [49; 66]	58 [49; 67]	0,98	49 [42; 66]	0,31
LDL/HDL-Ratio	2,3 [1,9; 2,9]	2,3 [1,7; 3,0]	<0,006	2,7 [1,9; 3,4]	0,23
Fibrinogen, mg/l	343 (290 bis 408)	322 (253 bis 420)	0,008	264 (248 bis 322)	0,020
hsCRP, mg/l	1,36 [0,91; 3,88]	1,32 [0,79; 3,21]	0,41	1,23 [0,67; 2,20]	0,21

P₁, Vergleich zwischen Ausgangswert und Zeitpunkt 5 Wochen; p₂, Vergleich zwischen Ausgangswert und Zeitpunkt 6 Monate; Werte angegeben als Median, in Klammern die entsprechenden 25. und 75. Perzentilen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden „fett“ markiert.

Tabelle 5: Vergleich der Laborparameter nach kardiovaskulärem Risikoprofil

		Gesunde Probanden	Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen	<i>p</i>
Gesamt-Cholesterin, <i>mg/dl</i>	Ausgangswert	197 [173; 224]	235 [196; 256]	<0,001
	5 Wochen	185 [173; 209]	239 [200; 270]	<0,0001
LDL-Cholesterin, <i>mg/dl</i>	Ausgangswert	121 [99; 145]	164 [121; 183]	0,0001
	5 Wochen	106 [95;130]	149 [119; 181]	<0,0001
HDL-Cholesterin, <i>mg/dl</i>	Ausgangswert	61 [56; 75]	54 [43; 63]	0,01
	5 Wochen	59 [51; 73]	57 [45; 64]	0,17
LDL/HDL-Ratio	Ausgangswert	2,0 [1,5; 2,4]	2,9 [2,3; 3,5]	<0,0001
	5 Wochen	1,8 [1,4; 2,3]	2,8 [2,1; 3,4]	<0,0001
Fibrinogen, <i>mg/l</i>	Ausgangswert	331 [271; 373]	368 [329; 459]	0,03
	5 Wochen	280 [249; 387]	352 [259; 449]	0,03
hsCRP, <i>mg/l</i>	Ausgangswert	1,07 [0,55; 2,07]	2,31 [1,23; 5,34]	<0,002
	5 Wochen	1,09 [0,54; 2,30]	2,41 [1,04; 3,76]	0,02

Vergleich der Ausgangswerte und zum Zeitpunkt nach 5 Wochen zwischen den Subgruppen; Werte angegeben als Median, in Klammern die entsprechenden 25. und 75. Perzentilen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden „fett“ markiert.

4 Diskussion

Rauchen stellt nach wie vor das bedeutendste einzelne Gesundheitsrisiko und die führende vermeidbare Ursache frühzeitiger Sterblichkeit dar. Zahlreiche vorangegangene Studien konnten den Tabakkonsum als Risikofaktor für die Ausbildung einer Atherosklerose identifizieren und nachweisen, dass damit ein gesteigertes kardiovaskuläres Risiko verbunden ist (EZZATI et al. 2005). Lange bevor sich Herz-Kreislauf-Erkrankungen klinisch manifestieren, zeigen sich bereits Einschränkungen der endothelialen Funktion. Dass der schädliche Einfluss des Rauchens in einer gestörten Vasomotorik resultiert, ist inzwischen gut belegt (CELERMAJER et al. 1993, HEITZER et al. 1996, MAHMUD und FEELY 2003, NEUNTEUFL et al. 2002, ZEIHNER et al. 1995). Dabei wird die beschriebene endotheliale Dysfunktion infolge von NO-Mangel als frühes Stadium der Atherosklerose angesehen (VERMA und ANDERSON 2002).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung, inwiefern sich eine systematische Raucherentwöhnung auf Prädiktoren endothelialer Dysfunktion auswirkt. Neben den bekannten Risikofaktoren Lipidstatus und Akutphaseproteinen Fibrinogen und hsCRP sollte diese Arbeit zusätzlich den Einfluss von EPC und ADMA als neuere Marker untersuchen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien wurden nicht nur gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen sondern auch solche mit kardiovaskulärem Risikoprofil, um Hinweise bezüglich akuter und chronischer Stimuli auf die endotheliale Funktion und Integrität aufzuzeigen. Es galt zu überprüfen, ob der atherogene Effekt des Rauchens durch eine Raucherentwöhnung beeinflusst werden kann und ob diese Intervention somit ein effektiver Weg zur Senkung des kardiovaskulären Risikos darstellt.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser prospektiven Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1) Durch die Raucherentwöhnung war eine signifikante Abnahme von acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen zu verzeichnen. Vor allem bei Probanden mit bereits bestehendem kardiovaskulärem Risikoprofil resultierte der Rauchstopp in einer deutlichen Senkung der EPC-Zahlen.
- 2) Die Serumkonzentration von ADMA konnte durch Nikotinentwöhnung gesenkt werden, wobei eine signifikante Senkung der ADMA-Spiegel bei Probanden mit kardiovaskulärer Anamnese ermittelt werden konnte.

- 3) Die Untersuchung der Akutphaseproteine zeigte, dass die fünfwöchige Nikotinentwöhnung zu keiner deutlichen Änderung der hsCRP-Konzentrationen führte, jedoch konnte eine signifikante Senkung des Fibrinogens detektiert werden. In der Analyse des Lipidstatus konnte insbesondere das LDL-Cholesterin nach Rauchstopp deutlich reduziert werden.

4.1 Erfolg der Tabakentwöhnung

Anfang 2002 wurde das Raucherentwöhnungsprogramm, das in dieser Arbeit vorgestellt wird, im Herzzentrum der Universitätsmedizin Göttingen etabliert. Inhaltlich entspricht dieses Programm dem in Deutschland üblichen Ansatz zur Nikotinentwöhnung: einem standardisierten, verhaltenstherapeutischen Vorgehen mit behavioralen und kognitiven Aspekten unter Einbeziehung unterstützender pharmakologischer Methoden. In einer eigenen Studie zeigte die Raucherentwöhnungsambulanz, dass nach 12 Monaten eine Nichtraucherquote von 27,1% erzielt werden konnte (FELTEN et al. 2006).

Der Erfolg der Raucherentwöhnung wurde anhand der mittleren Anzahl gerauchter Zigaretten gemessen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Reduktion des Zigarettenkonsums über den Zeitraum des Programms und noch 6 Monate danach verzeichnet werden. Der Validierung des Rauchverhaltens diene neben der Selbstaussage der Probanden die Messung des expiratorischen CO-Gehaltes. Hier konnte eine deutliche Abnahme der CO-Konzentration in der Ausatemluft am Ende des Programms detektiert werden. Dabei zeigten 93,6% der Probanden einen CO-Gehalt im Bereich zwischen 0-6 ppm, welcher dem eines Nichtrauchers entspricht (MIDDLETON und MORICE 2000).

Ohne Zweifel ist unabhängig von den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen der positive Effekt einer Raucherentwöhnung bewiesen und spielt eine entscheidende Rolle in der primären und sekundären Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

4.2 Einfluss der Tabakentwöhnung auf bekannte Marker endothelialer Dysfunktion

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Studien konnten bereits Hinweise darauf geben, inwiefern etablierte Marker der Atherosklerose wie Lipoproteinstatus, hsCRP und Fibrinogen mit dem Risiko und Ausmaß der Erkrankung korrelieren. Es galt zu prüfen, wie sich eine systematische Raucherentwöhnung auf das proatherogene und inflammatorische Profil der Probanden anhand dieser Marker auswirkt.

Die Atherosklerose wird bedeutend verstärkt durch das Vorhandensein abnormer Lipid- und Lipoproteinkonzentrationen, in Kombination mit Zigarettenrauchen ist der gesundheitsschädigende Einfluss erheblich gesteigert. Verschiedene Studien haben diesen Zusammenhang schon darstellen können (CRAIG et al. 1989, MJØS 1988, YUSUF et al. 2004). Die gewonnenen Proben wurden vor und nach Rauchstopp sowie 6 Monate nach Beendigung des Entwöhnungsprogramms entnommen. Die laboranalytische Bestimmung erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Reagenzlösungen.

Das wesentliche Ergebnis der Lipoproteinanalytik war die signifikante Abnahme an LDL-Cholesterin bereits nach 5 Wochen Nikotinentwöhnung sowohl im Gesamtkollektiv als auch in der Subgruppenanalyse bezüglich des Risikoprofils. Nach 6 Monaten konnten im Gesamtkollektiv in allen Cholesterin-Fractionen keine statistisch signifikanten Ergebnisse gezeigt werden. Es muss hervorgehoben werden, dass Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen signifikant höhere Spiegel an LDL-Cholesterin aufwiesen. Dem LDL-Cholesterin wird eine besonders ausgeprägte atherogene Wirkung zugeschrieben. So konnte bereits eine lineare Beziehung zwischen der LDL-Konzentration und dem Risiko für eine KHK nachgewiesen werden (YUSUF et al. 2004). Zwar führte der Rauchstopp in dieser Arbeit zu keiner signifikanten Erhöhung des HDL-Cholesterins im Gesamtkollektiv, aber im Verhältnis fand sich eine deutliche Reduktion der LDL/HDL-Ratio. Frühere Studien konnten eine Verbindung zwischen Rauchstopp und dem damit verbundenen Anstieg des HDL-Cholesterins herstellen (MOFFAT 1988, STUBBE et al. 1982), wobei in diesen Untersuchungen keine deutlichen Änderungen der anderen Cholesterinfraktionen resultierten. Interessanterweise fand sich in dieser Studie durch die Aufteilung der Probanden nach ihrem Risikoprofil, dass bei Probanden mit Risikoprofil dieser bereits beschriebene Anstieg an HDL-Cholesterin reproduziert werden konnte, verbunden mit einer deutlichen Abnahme des LDL/HDL-Quotienten. Da die Datenlage über die protektiven Eigenschaften des HDL-Cholesterins als kontrovers anzusehen ist, kann die Bedeutung des HDL-Anstiegs nur spekulativ beurteilt werden, da insbesondere Alter und kardiovaskuläres Risikoprofil dessen Konzentration beeinflussen und demzufolge individuell betrachtet werden sollten (JELLINGER et al. 2012). Möglicherweise lassen die vorgelegten Resultate bei Menschen mit kardiovaskulärer Anamnese eine positive Assoziation hinsichtlich der erfolgreichen Sekundärprävention und der resultierenden Abnahme des atherogenen Risikoprofils erkennen. Des Weiteren wird die Atherosklerose nach heutigem Kenntnisstand als inflammatorisches Geschehen verstanden, in das neben dem Komplementsystem Entzündungszellen, oxidierte

Lipidpartikel und anderen Akutphaseproteine auch das CRP und Fibrinogen involviert sind. Frühere Untersuchungen konnten den Zusammenhang zwischen dem Zigarettenrauchen und den konsekutiv gebildeten CRP und Fibrinogen bereits aufzeigen (FOLSOM 1995, YANBAEVA et al. 2007). Dabei scheinen erhöhte Konzentrationen dieser Marker mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert zu sein (DANESH et al. 1998, RIDKER 2003). Aufgrund der beschriebenen proatherogenen Eigenschaften von CRP und Fibrinogen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss des chronischen Tabakkonsums und folglich die Auswirkung einer Raucherentwöhnung untersucht.

Für die Messung des CRP wurden hoch-sensitive Assays verwendet, die mittlerweile im klinischen Alltag zur Anwendung kommen. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes hatte eine Raucherentwöhnung im Gesamtkollektiv keinen statistisch messbaren Einfluss auf die hsCRP-Konzentrationen, lediglich eine nicht signifikante Abnahme konnte dargestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Konsens mit Daten früherer prospektiver Studien, die zeigen konnten, dass CRP noch 10 Jahre und länger nach Rauchstopp deutlich erhöht ist im Vergleich zu Menschen, die niemals geraucht haben (FRÖHLICH et al. 2003, LOWE et al. 2001, WANNAMETHEE et al. 2005). Proinflammatorische Prozesse werden angeschuldigt, eine im Sinne einer endothelialen Dysfunktion atherogene Wirkung zu besitzen, weswegen einer Senkung der CRP-Spiegel eine hohe Bedeutung hinsichtlich des Risikos für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse zukommt (RIDKER 2003, VERMA et al. 2005). Insbesondere die hier dargestellte Risikogruppe wies signifikant höhere hsCRP-Konzentrationen auf, weswegen gerade bei diesem Kollektiv einer Nikotinentwöhnung eine hohe Bedeutung zukommen würde. Denn zusammenfassend blieben die medianen hsCRP-Level der ehemaligen Raucher im Bereich von 1-3 mg/l, was nach Empfehlung der *Centers for Disease Control* und der *American Heart Association* weiterhin mit einem moderaten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist.

Bisherige Vergleichsstudien zwischen Rauchern und Nichtrauchern konnten zeigen, dass Raucher höhere Spiegel an Fibrinogen aufweisen und diese nach Rauchstopp konstant abfallen, jedoch mehr als 10 Jahre noch erhöht bleiben (FOLSOM 1995, KROBOT et al. 1992). Die in dieser Studie dargestellten Messungen nach der Methode nach Clauss untermauern diese Ergebnisse, da eine signifikante Abnahme an Fibrinogen nach bereits 5 Wochen und weiterhin nach 6 Monaten Raucherentwöhnung detektiert wurde. Diese Reversibilität durch erfolgreiche Nikotinentwöhnung könnte einer Reduktion der prothrombotischen Tendenz und Plasmaviskosität entsprechen und somit in einem

verminderten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse resultieren. Im Vergleich mit der Gruppe der „gesunden Probanden“ zeigten die Probanden mit Risikoprofil vor und noch nach Entwöhnung signifikant erhöhte Konzentrationen an Fibrinogen, was besonders das kumulative Risikoprofil in dieser Gruppe verdeutlicht. Dies widerspiegelt auch hier die Relevanz der Prävention, da bekannt ist, dass mit Anstieg des Fibrinogen-Spiegels um 10 mg/dl die Wahrscheinlichkeit für ein kardiovaskuläres Ereignis respektive Tod um circa 3% steigt, unabhängig von anderen relevanten Risiken (PALMIERI et al. 2003).

4.3 Einfluss der Raucherentwöhnung auf die Anzahl zirkulierender EPC

Die verschiedenen Methoden zur Gewinnung der EPC sowie unterschiedliche Definitionen, was als Endothelvorläuferzelle bezeichnet wird, erschweren die Vergleiche mit anderen Arbeitsgruppen. Die Anzahl der zirkulierenden EPC im peripheren Blut wurde in der vorliegenden Arbeit durch 2 Methoden bestimmt: Zum einen mittels durchflusszytometrischer Analyse unter Verwendung der Antikörper CD34 und VEGFR2 und zum anderen durch Isolierung und Kultivierung von MNC und deren Markierung mit den für Endothelzellen typischen Markern acLDL und Lectin.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass chronische Raucher eine erhöhte Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen aufweisen und diese durch einen Rauchstopp bereits nach 5 Wochen statistisch signifikant reduziert wurde. Die Arbeitsgruppe um MICHAUD et al. untersuchte ein Studienkollektiv aus 15 chronischen Rauchern und 11 Nichtrauchern, um die Auswirkung des Rauchens auf die Anzahl und funktionelle Aktivität der EPC bei gesunden Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren nachzuweisen. Nach Isolierung aus dem peripheren Blut und viertägiger Kultivierung zeigte sich eine signifikant erniedrigte Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen in der Gruppe der Raucher verglichen mit der Kontrollgruppe. Ebenfalls konnte eine beeinträchtigte Proliferation und Migration der EPC bei Rauchern nachgewiesen werden. Die Untersuchung adhäsiver Eigenschaften der EPC und ihrer Fähigkeit zur Inkorporation in Gefäße zeigte bei Rauchern eine deutlich gestörte funktionelle Aktivität verglichen mit den Nichtrauchern (MICHAUD et al. 2006). Den Einfluss einer Raucherentwöhnung auf die EPC untersuchten KONDO et al. als eine der ersten. Auch hier bestand das Kollektiv aus 15, ebenfalls gesunden, ausschließlich männlichen Rauchern und 14 Nichtrauchern. Nach gescheiterter Zellkultur, die damit begründet wurde, dass isolierte CD34⁺ Zellen von Rauchern wesentlich kürzer leben, wurden weitere Untersuchungen mittels FACS durchgeführt. Dabei wiesen Raucher eine signifikant reduzierte Anzahl an PC (definiert als

CD45^{low}, CD34⁺, CD133⁺) verglichen mit denen der Nichtraucher auf, nach vierwöchiger Raucherentwöhnung kam es zum Anstieg der PC auf das Niveau der Nichtraucher. Der erneute Rauchbeginn führte wieder zu einer Reduktion der PC-Anzahl. EPC wurden durch die Hinzunahme des endothelspezifischen Markers VEGFR2 definiert, wobei dann auch KONDO et al. keinen signifikanten Effekt mehr erfassen konnten (KONDO et al. 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit führte ein Nikotinstopp zu keinem deutlichen Unterschied in der FACS-Analyse des Gesamtkollektives.

Möglicherweise stehen die Ergebnisse beider Studien, die vorwiegend den Fokus auf den Vergleich von gesunden Rauchern mit Nichtrauchern legten, nicht im Einklang mit der vorgelegten Arbeit, da hier ein verhältnismäßig großes, heterogenes Studienkollektiv untersucht wurde. Ziel war es, die Teilnehmer interindividuell vor und nach Rauchabstinenz zu betrachten. Weiterhin wurden auch Probanden mit bestehenden weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen eingeschlossen, mitunter bestand bereits eine medikamentöse Therapie. Da Änderungen bezüglich Erkrankungen und Medikamenten während des Beobachtungszeitraums zum Studienausschluss führten, lassen die gefundenen Ergebnisse einen Rückschluss darauf zu, dass Unterschiede auf die Raucherentwöhnung zurückzuführen sind.

Um pathologische und physiologische Effekte zu analysieren, wurden weiterhin Subgruppen gebildet. KONDO et al. untersuchten in ihrer Arbeit nur männliche Probanden (KONDO et al. 2004). Da bekannt ist, dass Östrogene die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen erhöhen können (STREHLOW et al. 2003), wurde ein möglicher geschlechtsspezifischer Einfluss untersucht, wobei in dieser Arbeit kein Unterschied in der EPC-Konzentration zwischen Frauen und Männern bestand.

Auch wurde der Aspekt, dass Teilnehmer Nikotinersatzprodukte zur unterstützenden Entwöhnung einnahmen, betrachtet. KONDO et al. berichteten über erhöhte, jedoch statistisch nicht signifikante EPC-Level bei den Probanden mit Nikotinersatztherapie (KONDO et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit nahmen ungefähr 70% der Teilnehmer Nikotinersatzprodukte ein. In der FACS-Analyse des Gesamtkollektives wurden signifikant höhere Konzentrationen an CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen bei den Probanden mit Nikotinersatztherapie nach Rauchstopp gemessen. Dagegen konnte dieses Ergebnis in der Zellkultur nicht reproduziert werden. Interessanterweise nahmen die Probanden mit Risikoprofil signifikant häufiger eine Nikotinersatztherapie in Anspruch. Im Vergleich zeigten auch diese Probanden nach 5 Wochen Rauchstopp signifikant höhere Zahlen

an CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen. Das Zigarettenrauchen gilt als die schnellste Nikotinapplikationsform, wobei durchschnittlich 1-3 mg Nikotin pro Zigarette freigesetzt wird. Die Absorption aus Nikotinersatzprodukten ist deutlich langsamer und nicht annähernd werden durch die verfügbaren Nikotinersatzprodukte so schnelle Konzentrationen erreicht. Allerdings konnten mit Nikotinplastern, die in unterschiedlichen Dosen verfügbar sind, Konzentrationen im Blut gemessen werden, die denen eines starken Rauchers entsprechen (STEAD et al. 2012). Es bleibt spekulativ, ob das freigesetzte Nikotin aus der Nikotinersatztherapie als Stimulus für die gefundene erhöhte Anzahl an EPC in der FACS fungiert haben könnte, wobei aufgrund ungenauer Angaben der Probanden und Wechsel der Nikotindosen der jeweiligen Präparate auf weitere Analysen verzichtet wurde.

KONDO et al. berichteten weiterhin, dass starke Raucher (≥ 20 Zigaretten pro Tag) deutlich weniger Endothelzellen aufweisen (KONDO et al. 2004). Dieser Effekt konnte in den vorgelegten Resultaten nicht reproduziert werden. Zu Beginn des Raucherentwöhnungskurses unterschieden sich die Subgruppen „leichte“ und „starke“ Raucher nicht. Jedoch wiesen ehemals „starke“ Raucher nach Nikotinstopp immer noch signifikant mehr acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen auf. Einen Unterschied in der Einnahme von Nikotinersatzprodukten gab es zwischen beiden Subgruppen nicht. Es gibt trotzdem Hinweise darauf, dass Nikotin allein zu einer Erhöhung der EPC-Zahlen führt. In der Studie von WANG et al. mit gesunden Nichtrauchern wurden die isolierten Proben vor der Kultivierung mit unterschiedlichen Nikotinkonzentrationen inkubiert. Dies führte zu einer Steigerung der Anzahl der EPC und förderte weiterhin die Proliferation, Migration und Adhäsion dieser Zellen bei physiologisch relevanten Konzentrationen bis max. 10^{-8} mmol/l Nikotin. Diese Konzentration ist äquivalent der Nikotinkonzentration im Blut von Rauchern (60-100 nmol/l Nikotin). Eine Zytotoxizität wurde bei Konzentrationen über 10^{-6} mmol/l Nikotin beobachtet (WANG et al. 2004). Auch in der Arbeit von HEESCHEN et al. zeigte sich in vitro nach Inkubation mit Nikotin eine dosisabhängige Steigerung der EPC. Ferner konnte hier im Mausmodell demonstriert werden, dass nach Induktion einer Ischämie des Hinterlaufs die systemische Gabe von Nikotin die Anzahl der EPC steigerte und diese Erhöhung mit einem Anstieg der Angiogenese im ischämischen Gewebe einherging (HEESCHEN et al. 2006). Eine weitere Arbeit überprüfte die Auswirkungen von Passivrauch auf die EPC bei gesunden Nichtrauchern. Dabei wurde nach lediglich 30-minütiger Exposition mit Passivrauch ein Maximum an CD133⁺, KDR⁺ Zellen nach einer Stunde beobachtet, nach 24 Stunden reduzierte sich die Konzentration wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe. Die zusätzliche durchflusszytometrische

Bestimmung von CD133⁺, KDR⁺ Zellen erreichte ebenfalls nach einer Stunde die maximale Konzentration, blieb aber auch noch nach 24 Stunden deutlich erhöht. Dieses Ergebnis konnte durch Kultivierung und Färbung mit den Markern Lectin und acLDL reproduziert werden. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass die mit Rauch exponierten EPC eine deutlich gestörte Chemotaxis in Richtung des Endothelfaktors VEGF zeigten, einhergehend mit einer gesteigerten EPC-Proliferation (HEISS et al. 2008a). Es wird angenommen, dass diese Störung durch einen Plasmfaktor vermittelt wird, der bisher noch nicht identifiziert werden konnte und die durch VEGF stimulierte NO-Produktion durch die EPC vermindert (CELERMAJER und NG 2008). Eine frühere Studie der Arbeitsgruppe um HEISS et al. konnte bereits aufzeigen, dass eine Hemmung der NOS zu einer verminderten Migration und erhöhten Proliferation der EPC führt (HEISS et al. 2008b).

Frühere Studien demonstrieren bereits, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren invers mit der Anzahl und Funktion der EPC korrelieren. Wird das Rauchen aus diesem kumulativen Risikoprofil isoliert betrachtet, so zeigen sich kontroverse Ergebnisse: VASA et al. konnten das Rauchen als stärksten Faktor für eine reduzierte Anzahl acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen identifizieren (VASA et al. 2001b), keine Unterschiede in der Anzahl der EPC wurden in der Arbeit von HILL et al. detektiert (HILL et al. 2003), und WERNER et al. konnten interessanterweise höhere Level an CD34⁺, KDR⁺ Zellen bei Rauchern finden (WERNER et al. 2005). Nach Aufteilung des Kollektivs in „gesunde Probanden“ und „Probanden mit weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen“ konnte hier eine signifikante Reduktion von acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen nach Nikotinentwöhnung in beiden Gruppen gemessen werden, insbesondere war dieser Abfall bei Probanden mit Risikoprofil deutlicher. Keine Unterschiede in der Subgruppenanalyse bezogen auf das Risikoprofil fanden sich dagegen in der FACS-Analyse. Die beobachtete signifikante Reduktion acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen in der Risikogruppe könnte vielleicht durch die Latenz der schädigenden Stimuli erklärt werden. Betrachtet man das Rauchen bzw. die Exposition mit Nikotin als akuten Reiz, andere Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie als chronifizierte Stimuli, so scheinen sich letztere Risikofaktoren in der Latenz ihrer Einwirkung von der Nikotinexposition zu unterscheiden. Demzufolge könnte der Anstieg der EPC nach Nikotinexposition als Antwort auf eine akute Gewebeischämie gedeutet werden. Da ausgereifte Endothelzellen nur limitierte Möglichkeiten zur Proliferation besitzen, werden endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und rekrutiert. Dieser zusätzliche Mechanismus könnte eine wesentliche Rolle in der Gefäßreparatur spielen. So

wurde beschrieben, dass nach induzierter Endothelschädigung die EPC zur Regeneration des geschädigten Areals beitragen (GRIESE et al. 2003, WALTER et al. 2002, WERNER et al. 2003). Dzau und seine Arbeitsgruppe konnten im Kaninchenmodell nach Gefäßverletzung eine beschleunigte Reendothelialisierung durch eine autologe EPC-Implantation aufzeigen, resultierend in einer Proliferationshemmung der glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima (GRIESE et al. 2003). Interessanterweise konnte bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ein Anstieg der EPC mit einem Maximum an Tag 7 beobachtet werden (SHINTANI et al. 2001). Auch Patienten mit nachgewiesener Herzinsuffizienz hatten in den Stadien NYHA I-II erhöhte EPC-Konzentrationen, während die Stadien NYAH III-IV eine verminderte Anzahl von EPC zeigten (VALGIMIGLI et al. 2004). Weiterhin fanden sich bei Patienten mit pAVK im frühen Stadium II nach Fontaine höhere EPC-Konzentrationen als im späten Stadium IV (MORISHITA et al. 2012). Dies könnte bedeuten, dass es systemische Reaktionen auf vielfältige Situationen der Gewebeschädigung zu geben scheint und abhängig vom Grad der endothelialen Schädigung in einem unterschiedlichen Ausmaß in der Mobilisierung der EPC resultiert. Auch die beobachtete Freisetzung der EPC nach physiologischem Stress in Form von Sport und körperlicher Aktivität könnte hiermit erklärt werden (LAUFS et al. 2004). TOUSOULIS et al. formulierten ebenfalls in ihrer Übersichtsarbeit eine Hypothese, dass sowohl Endothelzellen als auch EPC inflammatorischen Effekten unterworfen sind. So könnte es einen Zusammenhang zwischen der EPC-Mobilisation und der Latenz des einwirkenden Inflammationsgeschehen geben. Möglicherweise führt die anhaltende Entzündungsreaktion zu einer Art Erschöpfung des EPC-Pools im Knochenmark, weswegen nur noch weniger, allerdings auch unreife und funktionsgestörte EPC ausgeschüttet werden (TOUSOULIS et al. 2008).

EPC spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der endothelialen Integrität durch Reendothelialisierung von beschädigtem Endothel. Zusammenfassend könnten in dieser Arbeit zwei mögliche Mechanismen eine Rolle für die vorgelegten Resultate spielen: zum einen fungiert das Rauchen durch Induktion lokaler Gefäßschäden als Stimulus für die Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark im Sinne von Reparaturzellen; zum anderen könnte aber auch die erhöhte Anzahl kultivierbarer acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen bei Rauchern durch ein verändertes Adhäsionsverhalten ursächlich für die endotheliale Dysfunktion sein. Hierfür würde die hier unveränderte Anzahl CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen nach Raucherentwöhnung sprechen.

4.4 Einfluss der Raucherentwöhnung auf ADMA

Stickstoffmonoxid, welches aus L-Arginin durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in endothelialen Zellen synthetisiert wird, spielt eine entscheidende Rolle im Zusammenhalt vaskulärer Strukturen und Funktionen. Aus diesem Grund gilt NO auch als „endogenes anti-atherosklerotisches Molekül“ (COOKE und TSAO 1994). Ein Mechanismus, der das Vorkommen endothelialer Dysfunktion erklären könnte, ist die Anwesenheit von erhöhten Plasmakonzentrationen an ADMA. In früheren Studien konnte ADMA als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität identifiziert werden (SCHNABEL et al. 2005, VALKONEN et al. 2001). Aufgrund dieser Rolle als unabhängiger Risikofaktor erhielt ADMA zunehmend Bedeutung als therapeutische Zielgröße.

Das in dieser Studie verwendete Verfahren zur Messung von ADMA stützt sich auf die Arbeit von SCHULZE et al., wobei ADMA aus Patientenserum in einem kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassay bestimmt wurde (SCHULZE et al. 2004). Die vorliegende Arbeit ist die erste, die den Einfluss einer Raucherentwöhnung auf die ADMA-Spiegel von Aufhörwilligen untersuchte. Es konnte hier gezeigt werden, dass die systematische Raucherentwöhnung nach 5 Wochen zu einer signifikanten Abnahme der Serumkonzentration von ADMA im Gesamtkollektiv führt. Klinische Studien erzielten bisher unterschiedliche Resultate über die Wirkung des Tabakkonsums auf die Konzentration von ADMA im Blut, wobei in der Regel Raucher mit Nichtrauchern untersucht wurden. Zum einen fanden sich bei Rauchern niedrigere ADMA-Spiegel, die ferner mit einem erhöhten Risiko für koronare Ereignisse einhergingen (MAAS et al. 2007). Andererseits konnten aber auch signifikant höhere Werte von ADMA im Blut durch chronischen Nikotinkonsum detektiert werden (SCHNABEL et al. 2005, WANG et al. 2006, ZHANG et al. 2006), wie es in dieser Arbeit ebenfalls demonstriert werden konnte. SOBCZAK et al. fanden ebenfalls erhöhte ADMA-Konzentrationen bei gesunden Rauchern, konnten aber einen deutlicheren Zusammenhang zwischen Rauchen und reduzierten Plasmaspiegeln an L-Homoarginin herstellen (SOBCZAK et al. 2014). Im Gegensatz zu ADMA zeigen sich für das L-Arginin-Derivat Homoarginin protektive Eigenschaften bei kardiovaskulären Erkrankungen, resultierend aus einer verbesserten NO-Bioverfügbarkeit. Momentan sind die grundlegenden Pathomechanismen noch unklar und es bedarf zur Klärung weiterer Studien, allerdings gibt es bereits einige Hinweise darauf, dass ein erniedrigter Homoarginin-Spiegel als potentieller neuer Risikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität fungieren kann (MÄRZ et al. 2010).

Die *AtheroGene*-Studie zeigte, dass hohe ADMA-Konzentrationen eine prognostische Bedeutung für das Risiko und Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen haben und untermauerte ADMA als Biomarker solcher Ereignisse (SCHNABEL et al. 2005). Die vorgelegten Resultate zeigten in der Subgruppenanalyse bezüglich des kardiovaskulären Risikos, dass Probanden mit Risikoprofil höhere ADMA-Werte aufwiesen, und diese, auch wenn keine statistisch signifikanten Unterschiede aufzudecken waren, schlussfolgern lassen, dass eine Sekundärprävention in einer Senkung von ADMA als Risikomarker für endotheliale Funktionsstörungen resultieren kann, was somit auf vaskuläre Strukturen und Funktionen einen positiven Effekt haben könnte.

Die Regulation der Konzentration von ADMA im Plasma erfolgt im Wesentlichen durch zwei Enzyme: Bildung durch die PRMT-1 und Abbau durch die DDAH. Eine Akkumulation von ADMA könnte folglich ebenfalls in einer gestörten Aktivität dieser Enzyme resultieren. Es konnte bisher gezeigt werden, dass zahlreiche Faktoren Einfluss auf die Expression und Aktivität dieser Enzyme nehmen. In Hinsicht auf die Wirkung des Rauchens konnten Untersuchungen bei Ratten zeigen, dass eine orale Gabe von Nikotin zu einer verminderten Aktivität der DDAH in endothelialen Zellen führt, assoziiert mit einer Abnahme des ADMA-Metabolismus (JIANG et al. 2006). Auch in der Arbeit von ZHANG et al. wurde infolge des oxidativen Stresses, induziert durch Rauchextrakt, die Aktivität der DDAH inhibiert (ZHANG et al. 2006). Jedoch wurden bei Versuchen mit ähnlich experimentellem Ansatz auch hier unterschiedliche Resultate präsentiert. So demonstrierten MAAS et al. anhand von Zellkulturarbeiten, dass eine 48-stündige Exposition mit Zigarettenextrakt verminderte ADMA-Spiegel zur Folge hat. Experimentell schien dies durch eine Hochregulation der DDAH erklärbar zu sein (MAAS et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Tabakdosis und ADMA festgestellt werden.

Bisher gibt es keine weiteren Studien über den Einfluss einer Raucherentwöhnung auf ADMA, so dass der Effekt eines Nikotinstopps biochemisch unklar bleibt und es weiterer Experimente bedarf.

4.5 Studienkritik

Bei der Beurteilung der Studienergebnisse müssen verschiedene Einschränkungen berücksichtigt werden.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte nach Ankündigung während des Erstgespräches in der Raucherentwöhnungsambulanz am ersten Kurstag und die wiederholte Evaluation nach 5 Wochen. Initial wurden 115 Teilnehmer des Tabakentwöhnungsprogrammes zu Beginn ihres Kurses untersucht. Nach Beendigung des fünfwöchigen Tabakentwöhnungskurses konnten 79 Teilnehmer reevaluiert werden, von denen 67 die Einschlusskriterien erfüllten und letztlich in die Studie aufgenommen wurden. Gründe dafür, dass Probanden nicht wieder evaluiert werden konnten, waren der Abbruch des Entwöhnungskurses bzw. die fehlende Anwesenheit am letzten Kurstermin. Auch kann die erhöhte Verlustrate damit begründet werden, dass die Proben an nur 2 Terminen gewonnen wurden, nämlich über einen konstanten Zeitraum zu Beginn und am Ende des Raucherentwöhnungskurses. Es gibt keine Untersuchungen dazu, ob 5 Wochen ein geeigneter Zeitraum sind, um den Effekt der Raucherentwöhnung auf die EPC und die weiteren aufgeführten Risikomarker zu beurteilen.

Das Kollektiv stellt im Vergleich mit anderen Arbeiten eine große, heterogene Stichprobe dar. Dennoch ist die Zahl der untersuchten Probanden nicht hoch, weshalb bei stark streuenden Werten deren Aussagekraft durch die niedrigere Probandenzahl sinkt und eine nicht ausreichende statistische *Power* zur Detektion potentieller Veränderungen verfügbar war. Problematisch gestaltete sich auch die Rekrutierung nach 6 Monaten, da unabhängig vom abgeschlossenen Raucherentwöhnungskurs die Probanden hier einzig für die Evaluation und Blutentnahmen dieser Studie eingeladen wurden, weswegen eine sichtlich niedrigere Beteiligung zu vermerken war. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Untersuchungen hier deutlicher ausgefallen und statistisch zu sichern gewesen wären. Möglicherweise wären weitere statistisch relevante Effekte erkennbar gewesen, wenn die Probanden nicht nur interindividuell, sondern wie andere Arbeitsgruppen auch mit einer Kontrollgruppe verglichen worden wären. Letztlich eigneten sich die 12 Probanden, die am Kursende noch oder wieder rauchten, nicht als Kontrollgruppe, da diese kein konstantes Rauchverhalten zeigten und somit der chronische Einfluss des Rauchens fehlte.

Die Selbstaussage zum Rauchverhalten ist als verlässlich anzusehen (BARRUECO et al. 2005). Die Messung der endexpiratorischen CO-Konzentration erfolgte in Zusammenarbeit mit der Raucherentwöhnungsambulanz, weswegen kein Einfluss auf die Umstellung der Geräte zur CO-Detektion genommen werden konnte. Aus diesem Grund fand auch keine

Abstinenzkontrolle mittels CO-Messung nach 6 Monaten statt. In diesem Zusammenhang war zu Beginn der Arbeit eine Bestimmung der Cotinin-Spiegel im Urin angedacht, jedoch konnte ein entsprechendes Vorgehen aus methodischen Gründen nicht realisiert werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit bestand darin, dass nicht jeder Teilnehmer einen kompletten Datensatz aller Parameter aufweist. Aus diesem Grund wurden die Probanden für die Versuche randomisiert und ohne vorherige Selektion aufgeteilt. Statistisch konnte gezeigt werden, dass in den Subgruppen keine Unterschiede in den klinischen Charakteristika für die jeweils durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zu denen des Gesamtkollektives bestanden. Die Priorität in dieser Arbeit lag in der Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut. Durch deren begrenzte Anzahl im Blut musste bei 6 Teilnehmern auf eine FACS-Analyse verzichtet werden. Zum anderen konnten Experimente aus logistischen Gründen nicht gleichzeitig durchgeführt werden. So wurde die Methode zur Bestimmung von ADMA in dieser Arbeit erst zu einem späteren Zeitpunkt etabliert, weswegen 8 Probanden keine Messungen aufweisen. Trotz Antikoagulation des Blutes durch Verwendung von Citrat-Monovetten trat ein Clotting bei 11 Messungen von hsCRP und 9 von Fibrinogen ein, weswegen die Messungen des Probenmaterials nicht durchführbar waren. Für die Messung des Lipoproteinstatus eines Probanden war das abgenommene Serum nicht ausreichend für die Auswertung im Cell-Dyn. Die venösen Blutabnahmen könnten darüber hinaus als postprandial angesehen werden. Dies dürfte sich vor allem auf die Triglyzeridspiegel ausgewirkt haben, weswegen diese nicht aufgeführt wurden.

5 Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (PULS et al. 2011). In den folgenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, dass Mobilisierung und Funktionsstatus der EPC als 2 unabhängige Prozesse anzusehen sind. Bei gleichbleibender Anzahl an CD34⁺, VEGFR2⁺ Zellen, jedoch signifikant reduzierter Kultivierbarkeit von acLDL⁺, Lectin⁺ Zellen nach Raucherentwöhnung, sollten Gründe im Adhäsionsverhalten der Zellen aufgedeckt werden. Der Fokus wurde dabei auf die Expression von Integrinen sowie das Vorliegen von oxidativem Stress, verursacht durch das Rauchen, gelegt. Hierfür wurden weiterhin Teilnehmer des Raucherentwöhnungsprogramms der Universitätsmedizin Göttingen nach denselben Kriterien wie in dieser Arbeit rekrutiert.

Klinisch könnten zukünftig für eine individuelle kardiovaskuläre Risikoeinschätzung sowohl die Anzahl und Funktion der EPC als auch die Höhe der ADMA-Konzentration bestimmt werden. Als therapeutisches Ziel kommt einer Verbesserung der EPC-Funktion und der Senkung der ADMA-Spiegel eine hohe Bedeutung zu, was langfristig zu einem verminderten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen führen oder Krankheitsverläufe positiv beeinflussen könnte.

6 Zusammenfassung

Weltweit stellt der Tabakkonsum eine führende Ursache vermeidbarer Todesfälle dar. Dem Einfluss einer Raucherentwöhnung kommt dabei eine hohe Bedeutung zu. Die durch das Rauchen resultierenden morphologischen und funktionellen Veränderungen des Gefäßendothels, die sog. endotheliale Dysfunktion, scheinen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression einer Atherosklerose zu spielen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung einer systematischen Tabakentwöhnung in einem heterogenen Kollektiv Aufhörwilliger auf bereits bekannte wie auch neue Risikomarker und Prädiktoren der endothelialen Dysfunktion zu untersuchen. Dabei richtete sich hier erstmalig der Fokus der Untersuchung auf die Anzahl der EPC, wobei gezeigt werden konnte, dass bereits ein fünfwöchiger Rauchstopp zu einer signifikanten Reduktion der EPC führt. Die EPC-Erhöhung bei Rauchern ist am ehesten als reaktive Regulation auf einen Tabak-induzierten Endothelschaden zu interpretieren und diese scheint durch die Raucherentwöhnung rückführbar zu sein. Ob das Rauchen und weitere atherosklerotische Risikofaktoren sowie kardiovaskuläre Erkrankungen die Mobilisation und das Überleben der EPC direkt beeinflussen oder ob sie vielmehr über ständige Endothelschädigung zu einer Erschöpfung des Speichers im Knochenmark führen, ist noch unklar und muss in weiteren Arbeiten gezeigt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das proatherogene, inflammatorische Profil eines jeden Probanden, insbesondere bei denen, die bereits weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren oder Erkrankungen aufwiesen, durch die Tabakentwöhnung gesenkt werden kann.

Weitere Studien müssen klären, ob die hier erhobenen Ergebnisse auch über größere Zeiträume reproduzierbar sind und weitere Hinweise darauf geben können, inwiefern Tabakkonsum und Tabakentwöhnung Einfluss auf endotheliale Strukturen und Funktionen nehmen. Diese Ergebnisse sind wichtig, um die Notwendigkeit der Rauchprävention noch stärker zu untermauern.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes Low-Density-Lipoprotein
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
CO	Kohlenmonoxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyindol
ECM	Endothelzellmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPC	endotheliale Progenitorzellen
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszinoisothiocynat
HDL	High-Density-Lipoprotein
hsCRP	<i>high-sensitivity</i> C-reaktives Protein
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MNC	mononukleäre Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
pAVK	peripher-arterielle Verschußkrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin

PFA	Paraformaldehyd
ppm	<i>parts per million</i>
RT	Raumtemperatur
SC	<i>smoking cessation</i>
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: EPC nach 7-tägiger Kultivierung ohne Färbung	28
Abbildung 2: DAPI-Kernfärbung	29
Abbildung 3: Färbung mit FITC-konjugiertem Lectin	30
Abbildung 4: Färbung mit Dil-konjugiertem acLDL	30
Abbildung 5: Validierung des Rauchverhaltens durch expiratorische CO-Messung	38
Abbildung 6: Messung des exakten expiratorischen CO-Gehalts	39
Abbildung 7: Anzahl acLDL ⁺ , Lectin ⁺ Zellen im Gesamtkollektiv	40
Abbildung 8: Vergleich der Probanden ohne und mit Nikotinersatztherapie	41
Abbildung 9: Vergleich „leichte“ und „starke“ Raucher	42
Abbildung 10: Vergleich Frauen und Männer	43
Abbildung 11: Vergleich der Probanden ohne und mit Risikoprofil	44
Abbildung 12: Anzahl zirkulierender CD 34 ⁺ , VEGFR2 ⁺ Zellen im Gesamtkollektiv	45
Abbildung 13: Vergleich der Probanden ohne und mit Nikotinersatztherapie	46
Abbildung 14: Vergleich der Probanden ohne und mit Risikoprofil	47
Abbildung 15: Serumkonzentration von ADMA im Gesamtkollektiv	48

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probandencharakteristika	34
Tabelle 2: Epidemiologischer Gruppenvergleich	36
Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Probanden aus den vorliegenden Analysen	37
Tabelle 4: Laborparameter im Gesamtkollektiv	50
Tabelle 5: Vergleich der Laborparameter nach kardiovaskulärem Risikoprofil	51

8 Literaturverzeichnis

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P (2003): Asymmetric Dimethylarginine Causes Hypertension and Cardiac Dysfunction in Humans and Is Actively Metabolized by Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1455-1459

Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R (2004): Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 684-690

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997): Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275, 964-967

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228

Aymong ED, Curtis MJ, Youssef M, Graham MM, Shewchuk L, Leschuk W, Anderson TJ (2002): Abciximab Attenuates Coronary Microvascular Endothelial Dysfunction After Coronary Stenting. *Circulation* 105, 2981-2985

Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, Obayashi S (1995): Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 115, 1001-1004

Barrueco M, Jiménez Ruiz C, Palomo L, Torrecilla M, Romero P, Riesco JA (2005): Veracity of Smokers' Response Regarding Abstinence at Smoking Cessation Clinics. *Arch Bronconeumol* 41, 135-140

Batra A, Buchkremer G: Nichtraucher in 6 Wochen-ein Selbsthilfeprogramm für alle, die das Rauchen aufgeben wollen. Preuss, Ratingen 1997

Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK (2003): Relationship between Cigarette Smoking and Novel Risk Factors for Cardiovascular Disease in the United States. *Ann Intern Med* 138, 891-897

Böger RH (2003): The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 59, 824-833

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998a): Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction. Its Role in Hypercholesterolemia. *Circulation* 98, 1842-1847

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC (1998b): Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 32, 1336-1344

Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Spaet T (1970): Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh* 40, 163

Braunwald E (1997): Shattuck Lecture – Cardiovascular Medicine at the Turn of the millennium: Triumphs, Concerns, and Opportunities. *N Engl J Med* 337, 1360-1369

Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M (2003): Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Risk Prediction in Peripheral Arterial Disease: Additive Value of Flow-Mediated Dilatation to Ankle-Brachial Pressure Index. *Circulation* 108, 2093-2098

Celermajer DS (1997): Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible? *J Am Coll Cardiol* 30, 325-333

Celermajer DS, Ng MK (2008): Where There's Smoke... J Am Coll Cardiol 51, 1772-1774

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Llyod JK, Deanfield JE (1992): Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 340, 1111-1115

Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE (1993): Cigarette Smoking Is Associated With Dose-Related and Potentially Reversible Impairment of Endothelium-Dependent Dilatation in Healthy Young Adults. Circulation 88, 2149-2155

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE (1994): Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. J Am Coll Cardiol 24, 1468-1474

Chalon S, Moreno H, Benowitz NL, Hoffman BB, Blaschke TF (2000): Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. Clin Pharmacol Ther 67, 391-397

Chenot JF, Keller S (2004): Nikotinstopp-was hilft dabei? Z Allg Med 80, 113-118

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS et al. (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 91, 3527-3561

Cooke JP (2000): Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 2032-2037

Cooke JP (2004): Asymmetrical Dimethylarginine: The Über Marker? Circulation 109, 1813-1818

Cooke JP, Tsao PS (1994): Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14, 653-655

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Herrman MG, Herrington D et al. (2002): Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. A Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39, 257-265

Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE (1989): Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *Br Med J* 298, 784-788

Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R (1998): Association of Fibrinogen, C-reactive Protein, Albumin, or Leukocyte Count With Coronary Heart Disease. Meta-analyses of Prospective Studies. *JAMA* 279, 1477-1482

Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2004): Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *Brit Med J* 328, 1519-1528

Ernst E, Resch KL (1993): Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 118, 956-963

Ezzati M, Henley SJ, Thun MJ, Lopez AD (2005): Role of Smoking in Global and Regional Cardiovascular Mortality. *Circulation* 112, 489-497

Felten D, Raupach T, Sessler C, Lühje L, Hasenfuß G, Andreas S (2006): Effektivität eines kognitiv-verhaltenstherapeutischen Raucherentwöhnungsprogramms mit pharmakologischer Unterstützung. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 197-202

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990): Expression of the CD34 Gene in Vascular Endothelial Cells. *Blood* 75, 2417-2426

Folsom AR (1995): Epidemiology of fibrinogen. *Eur Heart J* 16 (Suppl. A), 21-24

Freeman DJ, Griffin BA, Murray E, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J (1993): Smoking and plasma lipoproteins in man: effects on low density lipoprotein cholesterol levels and high density lipoprotein subfraction distribution. *Eur J Clin Invest* 23, 630-640

Fröhlich M, Sund M, Löwel H, Imhof A, Hoffmeister A, Koenig W (2003): Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95). *Eur Heart J* 24, 1365-1372

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376

Garg UC, Hassid A (1989): Nitric Oxide-generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *J Clin Invest* 83, 1774-1777

Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA (2003): Predictive Value of Noninvasively Determined Endothelial Dysfunction for Long-Term Cardiovascular Events in Patients With Peripheral Vascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 41, 1769-1775

Greenland P, Smith Jr SC, Grundy SM (2001): Improving Coronary Heart Disease Risk Assessment in Asymptomatic People: Role of Traditional Risk Factors and Noninvasive Cardiovascular Tests. *Circulation* 104, 1863-1867

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ (2003): Isolation and Transplantation of Autologous Circulating Endothelial Cells Into Denuded Vessels and Prosthetic Grafts. Implications for Cell-Based Vascular Therapy. *Circulation* 108, 2710-2715

Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD (2003): Diverse Origin and Function of Cells With Endothelial Phenotype Obtained From Adult Human Blood. *Circ Res* 93, 1023-1025

Hamasaki H, Sato J, Masuda H, Tamaoki S, Isotani E, Obayashi S, Udagawa T, Azuma H (1997): Effect of Nicotine on the Intimal Hyperplasia after Endothelial Removal of the Rabbit Carotid Artery. *Gen. Pharmac* 28, 653-659

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102, 1340-1346

Heeschen C, Chang E, Aicher A, Cooke JP (2006): Endothelial Progenitor Cells Participate in Nicotine-Mediated Angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 48, 2553-2560

Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, Wong ML, Jahn S, Angeli FS, Minasi P et al. (2008a): Brief Secondhand Smoke Exposure Depresses Endothelial Progenitor Cells Activity and Endothelial Function: Sustained Vascular Injury and Blunted Nitric Oxide Production. *J Am Coll Cardiol* 51, 1760-1771

Heiss C, Wong ML, Block VI, Lao D, Real WM, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Springer ML (2008b): Pleiotrophin Induces Nitric Oxide Dependent Migration of Endothelial Progenitor Cells. *J Cell Physiol* 215, 366-373

Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H (1996): Cigarette Smoking Potentiates Endothelial Dysfunction of Forearm Resistance Vessels in Patients With Hypercholesterolemia. *Circulation* 93, 1346-1353

Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003): Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* 348, 593-600

Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S (1993): Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334, 170-174

Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, Hanrath P, Weber C (2007): Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 192, 413-420

Jellinger PS, Smith DA, Mehta AE, Ganda O, Handelsman Y, Rodbard HW, Shepherd MD, Seibel JA, AACE Task Force for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis (2012): American Association of Clinical Endocrinologists' guidelines for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis. American Association of Clinical Endocrinologists' Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis: executive summary. *Endocr Prac* 18, 1-78

Jiang DJ, Jia SJ, Yan J, Zhou Z, Yuan Q, Li YJ (2006): Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 683-693

John U, Hanke M (2001): Tabakrauch-attributable Mortalität in den deutschen Bundesländern. *Gesundheitswesen* 63, 363-369

Johnson HM, Gossett LK, Piper ME, Aeschlimann SE, Korcarz CE, Baker TB, Fiore MC, Stein JH (2010): Effects of Smoking and Smoking Cessation on Endothelial Function: One-Year Outcomes from a Randomized Clinical Trial. *Am Coll Cardiol* 55, 1988–1995

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3422-3427

Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Sschoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer Jr JE (2001): Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7, 1035-1040

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T (2001): Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circulation* 103, 634-637

Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A et al. (2004): Synergistic Effect of Bone Marrow Mobilization and Vascular Endothelial Growth Factor-2 Gene Therapy in Myocardial Ischemia. *Circulation* 110, 1398-1405

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoyer MM, Haller H, Fliser D (2004): Cardiovascular Effects of Systemic Nitric Oxide Synthase Inhibition With Asymmetrical Dimethylarginine in Humans. *Circulation* 109, 172-177

Kimoto M, Whitley GSJ, Tsuji H, Ogawa T (1995): Detection of N^G, N^G-Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase in Human Tissues Using a Monoclonal Antibody. *J Biochem* 117, 237-238

Kinlay S, Ganz P (1997): Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol* 80, 11I-16I

Koenig W, Ernst E (1992): The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis* 94, 93-107

Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T (2004): Smoking Cessation Rapidly Increases Circulating Progenitor Cells in Peripheral Blood in Chronic Smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1442-1447

Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA et al. (2000): AHA Dietary Guidelines: Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 102, 2284-2299

Krempl K, Maas R, Sydow K, Meinertz T, Böger RH, Kähler J (2005): Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J* 26, 1846-1851

Krobot K, Hense HW, Cremer P, Eberle E, Keil U (1992): Determinants of Plasma Fibrinogen: Relation to Body Weight, Waist-to-Hip Ratio, Smoking, Alcohol, Age, and Sex. Results From the Second MONICA Augsburg Survey, 1989-1990. *Arterioscler Thromb* 12, 780-788

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991): Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4651-4655

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G (2004): Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation* 109, 220-226

Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P (2002): S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: Further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13527-13532

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GSJ, Vallance P (1999): Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 343, 209-214

Letcher RL, Chien S, Pickering TG, Sealey JE, Laragh JH (1981): Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects. Role of fibrinogen concentration. *Am J Med* 70, 1195-1202

Levy D, Kannel WD (1988): Cardiovascular risks: New insights from Framingham. *Am Heart J* 116, 266-272

Lowe GD, Yarnell JW, Rumley A, Bainton D, Sweetnam PM (2001): C-Reactive Protein, Fibrin D-Dimer, and Incident Ischemic Heart Disease in the Speedwell Study. Are Inflammation and Fibrin Turnover Linked in Pathogenesis? *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 21, 603-610

Ludmer PL, Selwyn LP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P (1986): Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315, 1046-1051

Maas R, Schulze F, Baumert J, Löwel H, Hamraz K, Schwedhelm E, Koenig W, Böger RH (2007): Asymmetric Dimethylarginine, Smoking, and Risk of Coronary Heart Disease in Apparently Healthy Men: Prospective Analysis from the Population-Based Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease/Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg Study and Experimental Data. *Clin Chem* 53, 693-701

Mahmud A, Feely J (2003): Effect of Smoking on Arterial Stiffness and Pulse Pressure Amplification. *Hypertension* 41, 183-187

März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Böhm BO, Ritz E, Wanner C (2010): Homoarginine, Cardiovascular Risk, and Mortality. *Circulation* 122, 967-975

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A et al. (2005): Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105, 199-206

Mayhan WG, Kaushik PP (1997): Effect of nicotine on endothelium-dependent arteriolar dilatation in vivo. *Am J Physiol* 272, H2337-H2342

Michaud SÉ, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A (2006): Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 187, 423-432

Middleton ET, Morice AH (2000): Breath Carbon Monoxide as an Indication of Smoking Habit. *Chest* 117, 758-763

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997): A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning. *Blood* 90, 5013-5021

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi Z (1999): Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor. A Novel Marker of Atherosclerosis. *Circulation* 99, 1141-1146

Mjøes OD (1988): Lipid effects of smoking. *Am Heart J* 115, 272-275

Moffatt RJ (1988): Effects of cessation of smoking on serum lipids and high density lipoprotein-cholesterol. *Atherosclerosis* 74, 85-89

Moncada S, Higgs A (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012

Moon JH, Chae MK, Kim KJ, Kim HM, Cha BS, Lee HC, Kim YJ, Lee BW (2012): Decreased endothelial progenitor cells and increased serum glycated albumin are independently correlated with plaque-forming carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetes patients without documented ischemic disease. *Circ J* 76, 2273–2279

Moreno H Jr, Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, Blaschke TF (1998): Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. *Am J Physiol* 275, H1040-H1045

Morishita T, Uzui H, Nakano A, Mitsuke Y, Geshi T, Ueda T, Lee JD (2012): Number of endothelial progenitor cells in peripheral artery disease as a marker of severity and association with pentraxin-3, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Atheroscler Thromb* 19, 149-158

Neubauer S, Welte R, Beiche A, Koenig HH, Buesch K, Leidl R (2006): Mortality, morbidity and costs attributable to smoking in Germany: update and a 10-year comparison. *Tob Control* 15, 464-471

Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G, Schmid RW, Maurer G, Stefenelli T (2002): Contribution of nicotine to acute dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 39, 251-256

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666

Palmieri V, Celentano A, Roman MJ, de Simone G, Best L, Lewis MR, Robbins DC, Fabsitz RR, Howard BV, Devereux RB (2003): Relation of fibrinogen to cardiovascular events is independent of preclinical cardiovascular disease: The Strong Heart Study. *Eur Heart J* 145, 467-474

Parrott S, Godfrey C, Raw M, West R, McNeill A (1998): Guidance for Commissioners on the Cost Effectiveness of Smoking Cessation Interventions. *Thorax* 53 (Suppl 5), S2-S37

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F (2003): Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for

Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107, 499-511

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S (2000): Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958

Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath Jr C, Doll R (1996): Mortality from smoking worldwide. *Brit Med Bull* 52, 12-21

Puls M, Schroeter MR, Steier J, Stijohann L, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2011): Effect of smoking cessation on the number and adhesive properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol* 152, 61-69

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1987): The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 1482-1489

Raupach T, Schäfer K, Konstantinides S, Andreas S (2006): Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur Heart J* 27, 386-392

Raw M, McNeill A, West R (1998): Smoking Cessation Guidelines for Health Professionals. A guide to effective smoking cessation interventions for the health care system. *Thorax* 53 (Suppl 5), S1-S18

Rea TD, Heckbert SR, Kaplan RC, Smith NL, Lemaitre RN, Psaty BM (2002): Smoking Status and Risk for Recurrent Coronary Events after Myocardial Infarction. *Ann Intern Med* 137, 494-500

Ridker PM (2003): Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* 107, 363-369

Rifai N, Ridker PM (2002): High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease. *Clin Chem* 47, 403-411

Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J, Rifai N (2001): Evaluation of Nine Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implications for Clinical and Epidemiological Applications. Part 2. *Clin Chem* 47, 418-425

Rohde LEP, Hennekens CH, Ridker PM (1999): Survey of C-Reactive Protein and Cardiovascular Risk Factors in Apparently Healthy Men. *Am J Cardiol* 84, 1018-1022

Ross R (1999): Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126

Ruff LK, Volmer T, Nowak D, Meyer A (2000): The economic impact of smoking in Germany. *Eur Respir J* 16, 385-390

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000): Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation* 101, 1899-1906

Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM (2005): Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events Proof of Concept for the Clinical Importance of Endogenous Vascular Repair. *Circulation* 111, 2981-2987

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T (2005): Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients With Coronary Artery Disease: Results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 97, e53-e59

Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A (2002): Vascular Structural and Functional Changes in Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence for the Roles of Abnormal Myogenic Responsiveness and Dyslipidemia. *Circulation* 106, 3037-3043

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH (2004): Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 42, 1377–1383

Seiler C, Hess OM, Buechi M, Suter TM, Krayenbuehl HP (1993): Influence of Serum Cholesterol and Other Coronary Risk Factors on Vasomotion of Angiographically Normal Coronary Arteries. *Circulation* 88, 2139-2148

Shi Q, Raffi S, Hong-DeWu M, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR et al. (1998): Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *Blood* 92, 362-367

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001): Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 103, 2776-2779

Sobczak A, Prokopowicz A, Radek M, Szula M, Zaciera M, Kurek J, Goniewicz ML (2014): Tobacco Smoking Decreases Plasma Concentration of the Emerging Cardiovascular Risk Marker, L-Homoarginine. *Circ J* 78, 1254-1258

Statistisches Bundesamt (2011): Mikrozensus-Fragen zur Gesundheit. Rauchgewohnheiten der Bevölkerung. URL: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Gesundheitszustand/Rauchgewohnheiten5239004099004.pdf?__blob=publicationFile [Stand 24.01.2011]

Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Hartmann-Boyce J, Cahill K, Lancaster T (2012): Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 11, Art. No.: CD000146

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G (2003): Estrogen Increases Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell Production and Diminishes Neointima Formation. *Circulation* 107, 3059-3065

Stubbe I, Eskilsson J, Nilsson-Ehle P. (1982): High-density lipoprotein concentrations increase after stopping smoking. *Br Med J* 284, 1511-1513

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes Jr DR, Lerman A (2000): Long-Term Follow-Up of Patients With Mild Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction. *Circulation* 101, 948-954

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-438

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC (2002): Human Endothelial Progenitor Cells From Type II Diabetics Exhibit Impaired Proliferation, Adhesion, and Incorporation Into Vascular Structures. *Circulation* 6, 2781-2786

Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C (2008): Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 201, 236-247

Urbich C, Dimmeler S (2004): Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 95, 343-353

Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1998): Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 62, 2425-2430

Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E et al. (2004): CD 34+ and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Various Degrees of Congestive Heart Failure. *Circulation* 110, 1209-1212

Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R (2001): Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginin. *Lancet* 358, 2127-2128

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992a): Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339, 572-575

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992b): Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20, 60-62

Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001a): Increase in Circulating Endothelial Progenitor Cells by Statin Therapy in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation* 103, 2885-2890

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001b): Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circ Res* 89, e1-e7

Verma S, Anderson TJ (2002): Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 105, 546-549

Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ (2002): A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106, 913-919

Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ (2003): Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* 108, 2054-2059

Verma S, Szmitko PE, Ridker PM: (2005): C-reactive protein comes of age. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2, 29-36

Wald NJ, Idle M, Boreham J, Bailey A (1981): Carbon monoxide in breath in relation to smoking and carboxyhemoglobin levels. *Thorax* 36: 366-369

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM (2002): Statin Therapy Accelerates Reendothelialization. A Novel Effect Involving Mobilization and Incorporation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Circulation* 105, 3017-3024

Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DEL (2006): Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis* 184, 383-388

Wang XX, Zhu JH, Chen JZ, Shang YP (2004): Effects of Nicotine on the Number and Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *J Clin Pharmacol* 44, 881-889

Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH (2005): Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 26, 1765-1773

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002): Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialization and Neointimal Formation. Effect of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1567-1572

Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G (2003): Intravenous Transfusion of Endothelial Progenitor Cells Reduces Neointima Formation After Vascular Injury. *Circ Res* 93, e17-e24

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G (2005): Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med* 353, 999-1007

West R, Hajek P, Stead L, Stapleton J (2005): Outcome criteria in smoking cessation trials: proposal for a common standard. *Addiction* 100, 299-303

Whitehead TP, Robinson D, Allaway SL (1996): The effects of cigarette smoking and alcohol consumption on serum liver enzyme activities: a dose-related study in men. *Ann Clin Biochem* 33, 530-535

Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB (1993): Nitric Oxide Protects Against Cellular Damage and Cytotoxicity From Reactive Oxygen Species. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9813-9817

World Health Organization (2008): WHO Report on the Global Tobacco Epidemic. The MPOWER package. URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596282_eng.pdf

World Health Organization (2013): WHO Report on the Global Tobacco Epidemic. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85380/1/9789241505871_eng.pdf?ua=1

Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF (2007): Systemic Effects of Smoking. *Chest* 131, 1557-1566

Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GDO (2000): Lifestyle and Hemostatic Risk Factors for Ischemic Heart Disease: The Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 271-279.

Yasue H, Hirai N, Mizuno Y, Harada E, Itoh T, Yoshimura M, Kugiyama K, Ogawa H (2006): Low-Grade Inflammation, Thrombogenicity, and Atherogenic Lipid Profile in Cigarette Smokers. *Circ J* 70, 8-13

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997): AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* 90, 5002-5012

Yoo JH, Lee SC (2001): Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158, 425-430

Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L (2004): Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364, 937-52

Zeiber AM, Drexler H, Saubier B, Just H (1993). Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 92, 652-662

Zeiber AM, Schächinger V, Minners J (1995): Long-term Cigarette Smoking Impairs Endothelium-Dependent Coronary Arterial Vasodilator Function. *Circulation* 92, 1094-1100

Zhang WZ, Venardos K, Dusting JC, Kaye DM (2006): Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability. Role of Arginine Metabolism and Oxidative Stress. *Hypertension* 48, 278-285

Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T et al. (1999): KDR Receptor: A Key Marker Defining Hematopoietic Stem Cells. *Science* 285, 1553-1558

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer und Herrn Prof. Dr. med. Stavros Konstantinides danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, ihre umfassende und kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit sowie die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe die wissenschaftlichen Methoden zu erlernen.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Miriam Puls für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für ihre wertvolle und verlässliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Ihre Hilfe und konstruktive Kritik trugen maßgeblich dazu bei, die vorliegende Arbeit zu erstellen.

Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des kardiologischen Labors danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und ihre Hilfestellung während der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei den Mitarbeitern der Raucherentwöhnungsambulanz Göttingen, der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie sowie des Institutes für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen für die gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.