

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Auswirkung der immunsuppressiven Basistherapie
(DMARD und Biologika) auf die
Endothelvorläuferzellen und das kardiovaskuläre Risiko
bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

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

vorgelegt von
Katharina Nemirovski
aus
Moskau, Russland

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referentin:	PD Dr. med. S. Patschan
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. F. Czepluch
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 02.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkung der immunsuppressiven Basistherapie (DMARD und Biologika) auf die Endothelvorläuferzellen und das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Patschan S, Nemirovsky K, Henze E, Scholze J, Müller GA, Patschan D (2014): Tocilizumab increases EPC regeneration in rheumatoid arthritis. In: Scand J Rheumatol 43, 528–530.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einführung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.3 Prognose.....	2
1.1.4 Pathogenese.....	3
1.1.5 Diagnose der rheumatoiden Arthritis.....	7
1.1.6 Diagnostik in der Klinik.....	9
1.1.7 Labordiagnostik.....	13
1.1.8 Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	15
1.2 Kardiovaskuläres Risiko bei rheumatoider Arthritis.....	19
1.3 Endotheliale Vorläuferzellen.....	22
1.3.1 Heterogenität der EPCs.....	23
1.3.2 Bedeutung der EPCs in der Diagnostik.....	23
1.3.3 EPC in der rheumatoiden Arthritis.....	25
1.4 Wachstumsfaktoren in RA und Atherosklerose.....	25
1.4.1 VEGF.....	25
1.4.2 Angiopoetin.....	26
1.4.3 SDF-1.....	27
1.5 Zielsetzung.....	28
2 Materialien und Methoden.....	30
2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung.....	30
2.2 Untersuchung der Endothelvorläuferzellen.....	30
2.2.1 Kultivierung der CFU-Hill-Kolonien.....	31
2.2.2 Validierung der EPCs mit Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.2.3 Materialien zur Bestimmung der EPCs.....	33
2.2.4 Quantifizierung der Gefäßwachstumsfaktoren.....	35
2.2.5 ELISA.....	35
2.2.6 ELISA am Beispiel von VEGF.....	36
2.2.7 Immunoassays.....	38
2.3 Untersuchung des Gefäßstatus.....	38
2.3.1 Pulswellengeschwindigkeit (PWV).....	39
2.3.2 Augmentationsindex (AIx).....	40
2.3.3 Tonometrische Datenerfassung.....	41
2.4 Framingham/ATP III Risk Score.....	43
2.5 Statistische Methoden.....	44
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Patientenkollektiv.....	45
3.2 CFU-ECs in der vorliegenden RA-Kohorte unter Einfluss von RA-Therapeutika.....	45

3.2.1	CFU-ECs in der RA-Kohorte und in der gesunden Kontrollgruppe.....	47
3.2.2	CFU-ECs unter Einfluss von Glukokortikoiden	47
3.2.3	CFU-ECs und therapiebegleitende Medikation.....	47
3.2.4	CFU-ECs und Krankheitsaktivität.....	49
3.2.5	CFU-ECs und Anti-CCP sowie seropositive RA.....	49
3.2.6	CFU-ECs und Framingham Score Risiko (FS).....	50
3.3	Stimulations- und Wachstumsfaktoren	51
3.3.1	Einfluss der RA-Therapeutika auf die Stimulations- und Wachstumsfaktoren.....	51
3.3.2	Einfluss von Prednisolon und Antihypertensiva auf Gefäßwachstumsfaktoren.....	53
3.3.3	Zusammenhang zwischen EPCs und Gefäßwachstumsfaktoren unter der antirheumatischen Therapie.....	54
3.3.4	Seropositive RA, CCP-AK und Gefäßwachstumsfaktoren.....	56
3.3.5	Gefäßwachstumsfaktoren bei RA-Patienten und gesunder Kontrollgruppe	56
3.3.6	Der Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Gefäßstimulationsfaktoren nach erfolgter Therapie	56
3.4	Auswirkung der antirheumatischen Medikation auf Serum-Lipid-Konzentration.....	57
3.5	DAS28	60
3.5.1	DAS28 im Vergleich unter Tocilizumab, Rituximab, TNF α - Blocker, MTX.....	60
3.5.2	PWV und Alx@75 im Hinblick auf DAS28.....	62
3.5.3	Krankheitsaktivität und RF bzw. Anti-CCP.....	63
3.5.4	Krankheitsaktivität und die Begleitmedikation.....	64
3.6	Framingham Score	64
3.6.1	Framingham Score bei RA unter antirheumatischer Behandlung	64
3.6.2	Framingham Score im Hinblick auf RF und Anti-CCP	66
3.6.3	Einfluss therapiebegleitender Medikamente auf das Framingham score	66
3.7	Pulswellengeschwindigkeitsanalyse und Augmentationsindex.....	69
3.7.1	Pulswellengeschwindigkeit und die antirheumatischen Medikamente	69
3.7.2	Augmentationsindex.....	70
3.7.3	PWV, ALX und Framingham Score	71
4	Diskussion.....	73
4.1	Vorstellung der Ergebnisse	73
4.2	Methotrexat und TNF α -Blocker	76
4.3	Tocilizumab im Hinblick auf CFU-ECs und PWV	77
4.4	Rituximab	79
4.5	Begleitmedikation NSAR und Antihypertensiva.....	80
4.6	Lipidspiegel unter der antirheumatischen Therapie.....	81
4.7	Gefäßwachstumsfaktoren und Chemokine unter antirheumatischer Therapie.....	82
4.7.1	VEGF.....	82
4.7.2	Angiopoetin-1.....	83
4.7.3	Angiopoetin-2.....	83
4.7.4	SDF-1	85
4.8	Allgemeines.....	87
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ulnardeviation und Gelenksdeformation bei einer Patientin mit RA.....	8
Abbildung 2: Schwanenhalsdeformität an der linken Hand bei einer Patientin	8
Abbildung 3: Hilfestellung zur Beurteilung der betroffenen Gelenke bei RA.....	11
Abbildung 4: MRT-Aufnahme der Hand eines RA-Patienten mit Handgelenksbeteiligung	12
Abbildung 5: Röntgenaufnahme der Hände zur Verlaufskontrolle bei RA.....	13
Abbildung 6: Isolierung der MNC mittels Ficoll	31
Abbildung 7: CFU-Hill-Kolonie unter dem Lichtmikroskop bei 150-facher Vergrößerung.	32
Abbildung 8: ELISA am Beispiel von VEGF	37
Abbildung 9: Erfassung der PWV mittels SphygmoCor®.....	40
Abbildung 10: Aortale Pulsdruckkurve und Augmentation.....	41
Abbildung 11: Vergleich von CFU-ECs im Verlauf in Bezug auf die Medikamentengruppen	46
Abbildung 12: Vergleich von CFU-ECs bei den RA-Patienten und einer gesunden Kohorte	47
Abbildung 13: Vergleich der CFU-ECs jeweils mit und ohne zusätzliche antihypertensive Behandlung im Verlauf.....	48
Abbildung 14: Vergleich der CFU-ECs bei Patienten mit und ohne anti-CCP-Ak.....	49
Abbildung 15: CFU-ECs in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko	50
Abbildung 16: Verhalten von SDF-1 [pg/ml] unter antirheumatischer Therapie im Verlauf	52
Abbildung 17: Verhalten von Ang-1 [pg/ml] unter antirheumatischer Therapie im Verlauf	52
Abbildung 18: Verhalten von CFU-ECs und Ang-2 [pg/ml] im Verlauf	55
Abbildung 19: Veränderung der LDL-Spiegel unter der jeweiligen RA-Therapie im Verlauf.....	58
Abbildung 20: Veränderung der HDL-Spiegel unter der RA-Medikation im Verlauf.....	59
Abbildung 21: Veränderung der Triglycerid-Spiegel unter der RA-Medikation im Verlauf.....	60
Abbildung 22: Verlauf von DAS28 innerhalb der Studienzeit.....	61
Abbildung 23: Zusammenhang zwischen DAS28 und PWV.....	63
Abbildung 24: Veränderungen im Framingham Scores innerhalb der Studienzeit unter der RA- Medikation	65
Abbildung 25: Einfluss der NSAR-Therapie auf den Framingham Score	67
Abbildung 26: Verteilung der Patienten mit und ohne antihypertensive Therapie auf die jeweiligen Risikogruppen in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko	68
Abbildung 27: Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulärem Risiko und PWV.	72
Abbildung 28: Überblick über CFU-ECs unter der antirheumatischen Therapie im Verlauf	73
Abbildung 29: Überblick über DAS28 unter der antirheumatischen Therapie im Verlauf.....	74
Abbildung 30: Überblick über SDF-1 unter der antirheumatischen Therapie im Verlauf.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR /EULAR Klassifikation 2010 zur Diagnostik der RA.	10
Tabelle 2: Klassifikation der rheumatoiden Arthritis nach Steinbrocker et al. (1949)	12
Tabelle 3: Verwendete Geräte zur EPC-Bestimmung.	33
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien zur EPC-Bestimmung.	34
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien zur EPC-Bestimmung.	34
Tabelle 6: Verwendete Immunoassays zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren und Chemokine.	38
Tabelle 7: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren und der Chemokine.	38
Tabelle 8: Vergleich von CFU-ECs in Bezug auf die Medikamentengruppen im Verlauf.....	46
Tabelle 9: CFU-ECs in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko	51
Tabelle 10: Einfluss der Prednisolon-Therapie auf die Wachstumsfaktoren	53
Tabelle 11: Einfluss der Antihypertensiva auf die Wachstumsfaktoren.....	54
Tabelle 12: Korrelation zwischen den CFU-ECs und den Gefäßwachstumsfaktoren	55
Tabelle 13: Vergleich der Serumkonzentration der Gefäßwachstumsfaktoren in der gesunden Kontrollgruppe und erkrankten Kohorte.	56
Tabelle 14: Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Wachstumsfaktoren	57
Tabelle 15: Einfluss der antirheumatischen Therapie auf die Krankheitsaktivität im Verlauf ...	61
Tabelle 16: Vergleich der antirheumatischen Therapeutika untereinander im Hinblick auf die Krankheitsaktivität	62
Tabelle 17: Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und PWV bzw. Alx	63
Tabelle 18: Verteilung der Patienten mit und ohne arteriellen Hypertonus auf die Krankheitsaktivitäten	64
Tabelle 19: Einfluss der antirheumatischen Therapie auf den Framingham Score (FS)	65
Tabelle 20: Verteilung anhand des FS nach erfolgter Therapie bei seropositiven und -negativen Patienten und mit und ohne Nachweis von Anti-CCP.....	66
Tabelle 21: Verteilung der Patienten anhand FS und der jeweiligen Zusatztherapie mit Prednisolon, bzw. NSAR, bzw. Antihypertensiva nach sechsmonatiger Behandlung.....	68
Tabelle 22: Altersverteilung in den jeweiligen vier Medikamenten-Gruppen	69
Tabelle 23: PWV im Verlauf der Studienzeit unter dem Einfluss der antirheumatischen Therapeutika.	70
Tabelle 24: PWV im Laufe der Studie unter Rituximab, Tocilizumab, TNF α -Blocker, MTX.	70
Tabelle 25: Alx@HR75 im Verlauf der Studienzeit unter dem Einfluss der antirheumatischen Therapeutika.	71
Tabelle 26: Alx im Laufe der Studie im Vergleich der vier Medikamentengruppen untereinander	71
Tabelle 27: Zusammenhang zwischen FS und PWV bzw. Alx	72

Abkürzungsverzeichnis

ACC/AHA	<i>American College of Cardiology/ American Heart Association</i>
acLDL	<i>Human acetylated low density lipoprotein</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AKA	Anti-Keratin-Antikörper
Alx	Augmentationsindex [%]
Alx@HR75	adjustierter Augmentationsindex auf eine Herzfrequenz von 75 Schlägen/Min.
Ang-1	Angiopoetin 1
Ang-2	Angiopoetin 2
Anti- CCP	Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide
AP	<i>Augmentation pressure</i>
Bcl 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CFU-ECs	<i>Colony forming unit-Endothelial cells</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
DAS 28	<i>Disease activity score 28</i>
DBP	diastolischer Druck
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	<i>Disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
EIA	enzymatische Immunadsorptionsverfahren
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
EMA	Europäische Arzneimittel Agentur
EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ESH	<i>European Society of Hypertension</i>
EULAR	<i>European League against Rheumatism</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLS	<i>Fibroblast-like-Sinoviozyten</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GK	Glukokortikoide

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
HF	Herzfrequenz
HIF-1α	Hypoxie-induzierter-Faktor-1 α
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL6R	Interleukin-6-Rezeptor
IFN-γ	Interferon- γ
i. v.	intravenös
KDR/VEGFR-2	<i>Kinase insert domain receptor/ vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
KI	Konfidenzintervall
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LVET	linksventrikuläre Austreibungszeit (<i>Ejection duration</i>)
MCV	mutiertes citrulliniertes Vimentin
MI	Myokardinfarkt
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NCEP/ATP III	<i>National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III</i>
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
NV	Normalverteilung
OEC	<i>Late-outgrowth EPCs</i>
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PG	Prostaglandin
PGF	<i>Placenta growth factor</i>
PP	Pulsdruck (<i>Pulse pressure</i>)
PWA	Pulswellenanalyse

PWV	Pulswellengeschwindigkeit
RA	Rheumatoise Arthritis
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i> (RANKL)
RF	Rheumafaktor
SBP	systolischer Druck
SD	Standardabweichung
SDF 1 α	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SMA-rabbit	<i>α-smooth-muscle-actin antibody</i> ®
SMR	<i>standard mortality ratio</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tie-2	Tyrosinkinase-Rezeptor 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 Einführung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische systemische Autoimmunerkrankung. Sie verläuft meist schubweise, führt jedoch zu einer progressiven, destruierenden Entzündung der Gelenke mitsamt des Sehnen- und Halteapparates. Hierbei kommt es zu Schmerzen, teigiger Schwellung und Bewegungseinschränkung mit folgender Deformierung und möglicher Ankylosierung der Gelenke mit entsprechenden Komplikationen.

Mitunter kann es bei schwerverlaufender RA nach Jahren zu extraartikulären Manifestationen kommen, wobei das kardiovaskuläre System, die Lunge, die Nieren, die Haut, die Augen oder das periphere Nervensystem betroffen sein können (Cojocar 2010).

1.1.1 Epidemiologie

Laut den statistischen Daten des Robert Koch-Institutes aus dem Jahre 2010 liegt die Prävalenz der RA in Deutschland zwischen 0,5 % und 0,8 % der erwachsenen Bevölkerung (Zink et al. 2010). Die Inzidenz steigt mit dem Alter an, wobei das mittlere Erkrankungsalter in der fünften Lebensdekade liegt. Die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr liegt bei Männern etwa bei 20 bis 30 / 100.000 und bei Frauen bei 40 bis 60 / 100.000. Frauen haben ein etwa dreifach höheres Risiko im Vergleich zu Männern an RA zu erkranken, jedoch gleicht sich dies mit steigendem Alter immer weiter aus, sodass bei einer Erstmanifestation jenseits des 75. Lebensjahres Männer und Frauen gleich oft betroffen sind (Oliver und Silman 2009).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie bleibt bis zum heutigen Tag größtenteils ungeklärt. Es gibt verschiedene Daten, die aber alle insgesamt darauf hindeuten, dass es sich bei der RA um eine polyätiologische Erkrankung handelt. Eine der gängigsten Hypothesen ist die Fehlregulation des Immunsystems, die vor allem durch erbliche Veranlagung, aber auch durch bestimmte Noxen und Umweltfaktoren verursacht wird, die im Weiteren aufgelistet werden.

Anhand von Familienstudien wurde festgestellt, dass Verwandte ersten Grades von Patienten mit RA drei bis fünf Mal häufiger eine RA im Laufe ihres Lebens entwickelten als in der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem wurde bei den monozygoten Zwillingen im Gegensatz zu den dizygoten eine Krankheitskonkordanz von 30 % versus 5 % beobachtet. Diese Daten deuten auf eine genetisch bedingte familiäre Häufung vor allem bei erosiver RA (Hemminki et al. 2009).

1976 stellte Stastny fest, dass 70 % der RA-Patienten eine erhöhte Prävalenz an HLA-DRw4 aufweisen. Durch weiterführende Studien wurde eine Assoziation zwischen RA und bestimmten Subtypen von DR4 und deren Vorkommen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen festgestellt. Man fand heraus, dass DRB1*0401, DRB1*0404 gehäuft bei Kaukasiern und DRB1*0405, DRB1*0408 vor allem im Mittelmeerraum und Japan bei RA-Erkrankten vorkommen (Fries et al. 2002; Yelamos et al. 1993). Diese und auch weitere Allele, die eine ähnliche Aminosäurefrequenz in der HLA-DRB-1-Region aufweisen, auch als *shared epitope* bekannt, führen zu einer höheren Prädisposition für die Entwicklung der RA und zu einer schlechteren Prognose (Gregersen et al. 1987). Das Epitop spielt eine wichtige Rolle bei der Präsentation des Antigens den T-Lymphozyten.

Für den Verlauf und die Prognose der RA ist die Gendosis (Kombination der Gene) relevant. Hatten die Patienten zwei mit der Krankheit assoziierte Gene, so zeigten sie meist ein schweres Fortschreiten der RA mit starken erosiven Veränderungen an den Gelenken und extraartikulären Manifestationen. Die Träger des *shared epitope*, vor allem mit der zweifachen Genausprägung, brauchten eine aggressivere und kombinierte Therapie (Roudier 2006).

Außer der genetischen Ursache werden auch infektiöse diskutiert. Es ist jedoch noch nicht gesichert, dass Viren oder Bakterien eine Autoimmunität auslösen können. Untersucht wurden der Epstein-Barr-Virus (EBV), Retroviren, Parvovirus B19, Herpesviren, Zytomegalievirus, Mykoplasmen und viele andere. Von besonderem Interesse ist vor allem der Epstein-Barr-Virus, da bei 80 % der an RA Erkrankten vermehrte Antikörperbildung gegen EBV und Virus-DNA in der Synovia nachgewiesen wurde. Außerdem ist die Anzahl EBV-infizierter B-Lymphozyten stark erhöht im Vergleich zur gesunden Population. Es gibt eine Aminosäurehomologie im HLA-DRw4 und dem EBV-Protein gp110, was über *shared epitope* möglicherweise zur RA-Pathogenese beiträgt (Ollier 2000).

Als weitere Risikofaktoren sind das weibliche Geschlecht, eine frühe Menarche und späte Menopause aufgrund der proinflammatorischen Wirkung der Sexualhormone, ein Alter über 45 Jahre, Übergewicht, Rauchen und Erkrankungen im Nasen-Rachen-Raum zu erwähnen (Oliver und Silman 2009).

1.1.3 Prognose

Die Risikofaktoren für die radiologische Progression und die Arbeitsunfähigkeit bei Patienten mit RA sind der Befall großer Gelenke, wie Schulter, Ellenbogen, Knie, Hüfte, Halswirbelsäule, eine anhaltende hohe Aktivität der Erkrankung und hohe Titer des Rheumafaktors (RF) und CRP. Zusätzlich gehört die rheumatoide Arthritis zu den prognostisch ungünstigen Erkrankungen und wird bezüglich des erhöhten kardiovaskulären Risikos mit dem Diabetes mellitus Typ II oder einer koronaren Dreifäßerkrankung verglichen.

Die Ursache für eine ungünstige Prognose der RA ist unter anderem eine lange Periode zwischen dem Auftreten der Krankheit und der Diagnose mit Einleitung einer adäquaten Therapie. Als weitere Faktoren gelten ein früher Befall der großen Gelenke, eine hohe Aktivität der RA, die nicht auf Therapie anspricht, eine initial seropositive (rheumafaktorpositive) RA, eine symmetrische Gelenkbeteiligung, ein hohes Erkrankungsalter, ein frühes Auftreten von Knochenusuren/-erosionen und Vorhandensein des HLA-DRw4-Allels.

Das Voranschreiten des Gelenkbefalls, die extraartikuläre Manifestation und die toxische Wirkung der Medikamente führen zu einer Minderung der Lebenserwartung um fünf bis zehn Jahre im Vergleich zu der gesunden Population. Das erhöhte Sterberisiko ist mit opportunistischen Infektionen, wie Pneumonie oder Pyelonephritis, Agranulozytose, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und vor allem mit kardiovaskulären Erkrankungen verbunden (Symmons 2002).

Durch eine rechtzeitige Einleitung der Therapie und eine gute Betreuung der Patienten mit RA kann man heute von einer Remissionsrate von über 50 % ausgehen (Zink et al. 2010). Die Remission tritt meist im Verlauf des ersten Jahres nach Ausbruch der Krankheit ein.

1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der RA ist sehr komplex und noch nicht ausreichend erforscht. Jedoch sind einige entscheidende Faktoren in der Entwicklung dieser rheumatischen Erkrankung entschlüsselt und erlauben so eine gezielte Therapie. Die chronische Entzündung wird vor allem durch Infiltration und nachfolgende Proliferation der immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen, T- und B- Lymphozyten und aktivierten Synovialfibroblasten in der Synovialis hervorgerufen, was wiederum zu einer Ausschüttung von Zellmediatoren – Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, des Weiteren zur Synthese der Autoantikörper (Anti-CCP) und Bildung von Immunkomplexen (Rheumafaktor) führt. Diese Prozesse fördern die Vaskularisation und die Hyperplasie der Synovialis (Pannusbildung), eine Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) mit einer verstärkten Synthese der Prostaglandine und Entwicklung einer Entzündungsreaktion, eine Ausschüttung von proteolytischen Enzymen und Aktivierung der Osteoklasten. All dies führt zu einer Zerstörung des gesunden Gewebes und zur Entstehung von Deformierungen des Gelenks (Cutolo et al. 2002).

Das Gelenk ist ein geschlossenes System, in dem es durch Bewegung zu einer Reibung der Flächen kommt und somit zum Abschilfern und Eindringen von Mikropartikel des Knorpels, der Synovialfibroblasten und Bestandteilen von Blut. Betrachtet man die Lage der Gelenke, so können diese einer möglichen Beeinflussung von außen unterliegen, durch Druck, kleinere Stöße, Verletzungen. Es kommt zu einer leichten Entzündungsreaktion mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Synovialvenolen für Leukozyten, besonders Lymphozyten und Monozyten. Während die gesunde Synovialmembran keine Lymphozyten aufweist, kommt es bei der RA zu einer massenhaften Infiltration mit T-Lymphozyten, Monozyten und B-Zellen. Die ein- bis dreizellige Deckzellschicht der Synovia besteht im normalen Zustand aus Makrophagen (A-Synoviozyten) und Fibroblasten (B-Synoviozyten) (Hitchon und El-Gabalawy 2011). Die wichtigste Funktion der Makrophagen ist die Phagozytose der Antigene und Präsentation dieser an die T-Lymphozyten. Hierbei handelt es sich sowohl um das Antigenmaterial lokalen Ursprungs, als auch aus dem peripheren Blut, welches möglicherweise durch Monozyten miteingeschleppt wird, welche die untergegangenen Makrophagen ersetzen. Die A-Synoviozyten phagozytieren die Antigene und präsentieren die Peptidfragmente über die Klasse-II-HLA-Moleküle, die sich an der Oberfläche der Makrophagen befinden. Nur so können die Antigene von den T-CD4⁺-Helferzellen erkannt werden. Diese proliferieren ihrerseits und sezernieren Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukine (IL), vor allem IL-1 und IL-6. Dadurch werden B-Lymphozyten zur Differenzierung in Plasmazellen und zur Produktion von Antikörpern angeregt. Nicht minder wichtig in der Zytokinkaskade ist der von der Monozyten-Makrophagen-Reihe sezernierte Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (Lubberts und van den Berg 2003).

Die Pathogenese der RA unterliegt einem engen Zusammenhang zwischen zwei Prozessen: einer antigenspezifischen Aktivierung der CD4⁺-T-Lymphozyten, die durch die Synthese von IL-2, IFN- γ und IL-17 charakterisiert wird und einem Ungleichgewicht zwischen der stark erhöhten Produktion der proinflammatorischen Zytokine und einem Mangel an den antiinflammatorischen Zytokinen (Choy und Panayi 2001). Diese Zytokindysbalance führt letztendlich zur Synovialitis, Erguss und Gelenkzerstörung.

Zytokine sind niedermolekulare Proteine, die über eine biologische Aktivität verfügen und sowohl in der sezernierten als auch membrangebunden Form vorkommen. Über entsprechende Zellrezeptoren können sie ihre Wirkung parakrin oder auch autokrin entfalten. Sie nehmen an der Hämatopoese, der Entzündungsreaktion, der Ausdifferenzierung der immunkompetenten Zellen und der Chemotaxis teil. Bei der RA ist der Hauptsyntheseort der Zytokine die Synovialmembran, gleichzeitig steigt deren Konzentration auch in der Synovialflüssigkeit an (McInnes und Schett 2007).

Als wichtigste proinflammatorischen Zytokine bei der RA sind Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) zu nennen. Sie sind für die chronisch-destruierende Synovialitis und systemische Manifestation der RA unter anderem verantwortlich.

Das von den Makrophagen sezernierter Zytokin TNF- α erreicht seine maximale Konzentration im aktiven Stadium der Erkrankung. Eine seiner Hauptwirkungen beruht auf der erhöhten Bildung von *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL), welches zur Ausdifferenzierung von Osteoklasten führt und somit die Knochenneubildung hemmt. Außerdem induziert TNF- α eine verstärkte Produktion von Adhäsionsmolekülen, Metallproteinasen, Kollagenasen und Prostaglandinen.

TNF- α wirkt synergistisch mit Interleukin-1 (IL-1), welches eine Freisetzung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark fördert, Makrophagen aktiviert und die synoviale Neoangiogenese antreibt. IL-1 führt zur Synthese unterschiedlicher Stoffe, die die Zerstörung von Knorpel und Gelenk begünstigen. Dieses Zytokin wird von A-Synoviozyten, Chondrozyten und Osteoklasten sezerniert (McInnes und Schett 2007).

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Glykoprotein und wird von den B-Synoviozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Endothelzellen gebildet. Im Krankheitsverlauf der RA werden hohe Spiegel in der Synovialmembran, Synovialflüssigkeit und im Serum gemessen. IL-6 fördert die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in den Hepatozyten, Antikörperproduktion von B-Lymphozyten, Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Aktivierung von Osteoklasten und Proliferation von Synovialfibroblasten (Brozik et al. 1992). Die pathologische Wirkung von IL-6 wird vor allem auf die Bildung von IgG im befallenen Gelenk und nachfolgend erhöhte IgG Serumspiegel zurückgeführt. Der IL-6-Spiegel korreliert bei der RA mit dem Grad der Aktivität der Erkrankung und dem Stadium des erosiven Befalls der Gelenke. Hohe Konzentrationen sind prognostisch ungünstig (Dasgupta et al. 1992).

TGF- β , Interleukine 4, 5, 10, 13 besitzen eine antiinflammatorische Wirkung und verlangsamen die Gelenksdestruktion.

IL-4, welches von den T-Helferzellen vom Th2-Typ sezerniert wird, kann ähnlich wie IL-10 die Produktion von Th1-Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) und die Aktivierung von NF- κ B inhibieren. Es fördert die Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten und die Produktion von IgE. Außerdem hemmt dieses Zytokin die Synoviozytenproliferation (Ohmura et al. 2005). Beim Versuch IL-4 als Therapeutikum einzusetzen, um der Knochendestruktion entgegenzuwirken, war seine Wirkung schwächer als die der anderen Basismedikamente. Somit spielt es momentan noch keine Rolle in der medikamentösen Therapie der RA (Lee et al. 2004).

Im frühen Stadium der RA findet man in der Synovia eine gesteigerte Expression der mRNA folgender Zytokine: TNF- α , IL-15 und IFN- γ . Im fortgeschrittenen Stadium kommt es nicht nur zu einer Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine, sondern auch zu einer stärkeren Produktion der mRNA der antiinflammatorischen Interleukine 4 und 10 (Kanik et al. 1998).

Es wird angenommen, dass durch die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren durch die A-Synoviozyten die lokalen *fibroblast-like*-Synoviozyten (FLS) und die B-Synoviozyten aktiviert werden. Dieser Prozess fördert seinerseits ein Anschwemmen weiterer entzündungsfördernder Zellen und eine Zerstörung der extrazellulären Matrix. Das an der Knorpel-Knochengrenze sich verdichtende Synovialgewebe, auch „Pannus“ genannt, verhält sich wie ein lokaler invasiv wachsender Tumor. Es besteht vor allem aus Makrophagen, Osteoklasten und invasiven FLS.

Die Herkunft der FLS ist umstritten. Es könnte sich hierbei um mesenchymale Stammzellen aus dem peripheren Blut oder um lokale Stammzellen aus der Synovia handeln. Es ist jedoch nachgewiesen, dass das Milieu, welches bei der RA im Gelenk vorliegt, deren Überleben und Proliferation eher begünstigen. Die „rheumatoiden“ Synoviozyten haben bestimmte Charakteristika und ähneln morphologisch eher den Tumorzellen. Im Vergleich zu anderen Fibroblasten zeigen sie ein invasiv-aggressives Wachstumsverhalten und führen zur Gelenksdestruktion. Diese Zellen sind autonom und unterstehen nicht mehr der Regulation des Immunsystems. Sie sezernieren vermehrt Metalloproteinasen, die durch Proteolyse das Kollagen und somit die extrazelluläre Matrix des Knorpels zerstören (Burrage et al. 2006). Die Funktionsänderung der FLS wird durch somatische Mutation in den Genen, die den Zellzyklus, die Proliferation und die Apoptose regulieren, verursacht. Die wichtigste Mutation findet man im Tumorsuppressorgen p53. Durch seine Inaktivierung kommt es zum Wachstum der FLS, Unterdrückung der Apoptose und vor allem zum aggressiven Verhalten der Synoviozyten (Bartok und Firestein 2010).

Das frühe Stadium der RA wird durch folgende morphologische Veränderungen beschrieben: Hyperplasie der Synoviamembran, Infiltrierung dieser durch Zellen aus der mononukleären Reihe und Neoangiogenese. Vor allem die Synovialfibroblasten haben präneoplastischen Charakter und ein hohes Potential zur Exprimierung von Protoonkogenen (Firestein 1996).

Das späte Stadium der RA unterscheidet sich durch eine Abnahme der proliferativen Vorgänge und eine starke Sklerosierung des Gelenks. Eine mögliche Erklärung für die Proliferation der rheumatoiden Synovia ist eine Dysbalance zwischen Intensität der Zellproliferation und der Apoptose.

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der RA ist ein Defekt in der Induktion der Apoptose in der Synovia, der zu einer Inhibierung oder zu einer Hyperaktivierung dieser führen kann. Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Apoptoserate zu. Somit kann man annehmen, dass die Apoptose eng mit dem Fortschreiten der rheumatoiden Synovitis verbunden ist. Die pathologische Umstrukturierung der Synovia läuft zeitgleich mit der Verminderung der Anzahl der Chondroblasten, die einem Prozess der Apoptose bei chronischer Entzündung unterliegen. Dies führt zu einer ungenügenden Regeneration des Knorpels und einer sekundären Arthrose (Smith und Walker 2004).

Die Apoptose kann über unterschiedliche Wege eingeleitet werden. Einer davon ist der mitochondriale, der durch die Ausschüttung des proapoptotischen Transkriptionsfaktors p53 induziert wird. Eine Schädigung von p53 führt zu „*tumor like proliferation*“ der Synoviozyten. Der andere Mechanismus entwickelt sich in den Lymphozyten und wird durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) geblockt.

Im Frühstadium der RA kommt es zu einer verstärkten Expression von Bcl-2 in der Synovia. Bei diesem, durch TNF- α und IL-1 induzierten Prozess, wird die Anzahl der apoptosefähigen Zellen reduziert und ein günstiges Milieu für das Entzündungsgeschehen geschaffen (Smith und Walker 2004). In diesem Stadium ist der apoptosefördernde p53-Faktor erniedrigt, somit ist auch der Apoptoseindex erniedrigt. Im Gegensatz dazu findet man im fortgeschrittenen Stadium eine starke Expression von p53 und eine verminderte von Bcl-2, was zu einem progressiven programmierten Zelltod im Gelenk führt (Dubikov und Kalinichenko 2010).

Fasst man orientierend die bekannten Faktoren der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis zusammen, kommt folgendes Bild zustande. Unter der Einwirkung eines unbekannten Stimulus kommt es zu einer Transformation der Synovialfibroblasten mit nachfolgender Proliferation und Adhäsion am Gelenkknorpel. Die Aktivierung der T-Lymphozyten und weitere Immunantwort mit der für die RA spezifischen Ausschüttung von Zytokinen führt zu einer immunologisch bedingten Entzündung und Zerstörung des Gelenks. Bis jetzt ist die Ätiologie und somit die Ursache der Aktivierung des Immunsystems und der Zellmigration in die Synovia noch nicht genau bekannt. Es ist der Gegenstand weiterer Forschungen.

1.1.5 Diagnose der rheumatoiden Arthritis

Das Erscheinungsbild der rheumatoiden Arthritis ist sehr vielseitig und somit ist die Diagnose der Erkrankung nicht immer einfach. Meist verläuft die RA langsam mit einer sukzessiven Entwicklung der Symptome über Monate oder sogar Jahre, seltener findet man eine akute oder subakute Form. Am Anfang manifestiert sich die Entzündung häufig im Bereich der Handwurzelknochen, der Metacarpophalangealgelenke oder der proximalen Interphalangealgelenke, jedoch können auch die großen Gelenke betroffen sein. Die Beschwerden begrenzen sich meist auf ein oder mehrere Gelenke und entwickeln sich erst im Laufe der Zeit zu einem symmetrischen Befall. Die am meisten charakteristische klinische Ausprägung der RA ist ein Schmerz in den betroffenen Gelenken, der bei Bewegung zunimmt. Die Schmerzen treten vor allem in Ruhe und spontan vor allem in der zweiten Hälfte der Nacht auf und können außerdem durch Druck auf das Gelenk ausgelöst werden. Der Schmerz entsteht durch Reizung der Gelenkkapsel, die sehr empfindlich auf Dehnung und Druck reagiert. Begleitend tritt eine Morgensteifigkeit, die bis zu einigen Stunden anhalten kann, teigige

Schwellung, Überwärmung und Bewegungseinschränkung auf. Viele Patienten zeigen auch unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Fieber.

Die RA ist oft mit anderen Erkrankungen des Bewegungsapparates assoziiert – Osteoarthrose, Karpaltunnelsyndrom, Bursitis, Bakerzyste etc. Mit einem Fortschreiten der Erkrankung kommt es auch zu typischen Deformierungen der Gelenke: Ulnardeviation der Finger, Schwanenhals-, Knopflochdeformität, Z-Deformität der Hand, Caput ulnae Syndrom, Spreizfuß mit Hallux valgus, Hammerzehen, Verlust des medialen Fußgewölbes, subaxiale Instabilität der HWS mit möglicher Rückenmarksschädigung. Die Ursachen dafür liegen in der Schädigung und Schwäche des Halteapparats und des Gelenks.



Abbildung 1: Ausgeprägte Ulnardeviation und Gelenksdeformation bei einer Patientin aus der rheumatologischen Sprechstunde am Uniklinikum Göttingen. ED 1994, seropositive, Anti-CCP positive RA.



Abbildung 2: Schwanenhalsdeformität an der linken Hand. Patientin aus der rheumatologischen Sprechstunde Uniklinikum Göttingen.

Neben der Gelenkbeteiligung, findet man bei rheumatoiden Erkrankungen mit einem schweren Verlauf auch extraartikuläre Manifestationen. Solche Organe wie Nieren, Herz, Lunge, Gefäße, Haut, Auge und das periphere Nervensystem können betroffen sein.

Bei 20 bis 30 % der Patienten mit RA treten Rheumaknoten auf. Histologisch zeigt sich eine zentrale fibrinoide Nekrose mit Kollagenfasern und Zelldetritus. Untersuchungen ergaben, dass eine Vasculitis die Grundlage für die Entstehung der Knötchen bildet. Normalerweise findet man sie in Gelenknähe am Ellenbogen, Achillessehnenbereich, manchmal kommen sie aber auch in der Pleura oder Gehirnhäuten vor. Sie weisen unterschiedliche Größen auf, verursachen meist keine Schmerzen, können sich aber infizieren.

Bei der kardiovaskulären Beteiligung ist die Atherosklerose (Kapitel 1.2), arterielle Hypertonie und die Perikarditis hervorzuheben. Männer sind häufiger durch eine Lungenmanifestation betroffen, die sich in Form von Pleuritis, subpleuralen Rheumaknoten oder pulmonaler Hypertonie äußert. Eine Augenbeteiligung tritt bei unter 1 % der Patienten in Form von Episkleritis oder Skleritis auf. Zu erwähnen sei auch das Felty-Syndrom, welches eine Kombination aus RA gefolgt von einer Splenomegalie und einer Neutropenie mit Anämie und Thrombozytopenie darstellt. Es ist oft begleitet durch einen plötzlichen Anstieg der Rheumafaktoren, Vorkommen von Rheumaknoten und anderen extraartikulären Manifestationen.

1.1.6 Diagnostik in der Klinik

Eine ausführliche Anamnese und eine klinische Untersuchung in Verbindung mit einer umfangreichen Labor- und einer radiologischen Diagnostik liefern den Nachweis für RA.

1987 entwickelte das *American College of Rheumatology* (ACR) diagnostische Kriterien der Rheumatoiden Arthritis. Deren Sensibilität lag bei 91-94 % und die Spezifität bei 89 %. Beim Erfüllen von mindestens vier der sieben Kriterien sprach man von RA. Zu Bedenken sei jedoch gewesen, dass im Frühstadium der RA, trotz des Vorliegens der Erkrankung, die Kriterien nicht ausreichend erfüllt worden sind.

Seit 2010 gibt es eine neue Klassifikation, die in Zusammenarbeit zwischen ACR und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) erstellt wurde. Die Kriterien des ACR wurden weitestgehend überarbeitet, das Punktesystem erweitert und die Serologie und die Autoimmundiagnostik spielen eine größere Rolle. Es erfolgt eine Einteilung in vier Bereiche: Anzahl und Größe der betroffenen Gelenke (0-5 Punkte), Pathologien in der Serologie (0-3 Punkte), erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) (0-1 Punkte) und die Beschwerdedauer (0-1 Punkte). Insgesamt können bis zu zehn Punkte erreicht werden. Dank diesen Veränderungen können auch Patienten in einem frühen Stadium besser erkannt und frühzeitig behandelt werden (Aletaha et al. 2010).

Tabelle 1: ACR /EULAR Klassifikation 2010 zur Diagnostik der RA.

Gelenkbefall	
1 großes Gelenk (Schulter, Ellbogen, Hüfte, Knie, Sprunggelenk)	= 0
2-10 große Gelenke	= 1
1-3 kleine Gelenke (Handgelenk, MTP 2-5, MCP, PIP)	= 2
4-10 kleine Gelenke	= 3
> 10 Gelenke, mind. 1 kleines	= 5
Beschwerdedauer	
< 6 Wochen	= 0
≥ 6 Wochen	= 1
Serologie	
RF und Anti-CCP negativ	= 0
Mind. RF oder Anti-CCP niedrig positiv (<3U/ml)	= 2
Mind. RF oder Anti-CCP hochtitrig positiv	= 3
Akutphaseprotein	
CRP und BSG normal	= 0
CRP und BSG positiv	= 1

Um die Krankheitsaktivität bei RA-Patienten besser vergleichen zu können, wird in der Klinik der DAS 28 (*disease activity score*) angewandt. Dieses von EULAR entwickelte System erlaubt die Wirksamkeit von Medikamenten, die Remission oder den Fortschritt der Erkrankung zu beurteilen. Hierbei werden 28 Gelenke (Finger-, Hand-, Ellenbogen-, Schulter- und Kniegelenke) auf Druckschmerz und Schwellung untersucht. Des Weiteren werden die Blutsenkungsgeschwindigkeit nach einer Stunde und die subjektive Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten auf einer visuellen Analogskala von 0-100 in die Berechnung miteinbezogen. Für die Ermittlung des Ergebnisses der DAS28 mit einem Punktwert zwischen 0 bis 10 wird die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{DAS28} = 0,56 \times \sqrt{\text{druckschmerzhaftes Gelenke}} + 0,28 \times \sqrt{\text{geschwollene Gelenke}} + 0,70 \times \ln(\text{BSG}) + 0,014 \times \text{Pat.-urteil}$$

Ein Wert ≤ 3,2 gibt eine fehlende bis geringe Krankheitsaktivität an, ein DAS > 3,2 ≤ 5,1 zeigt eine mäßige Aktivität und Werte > 5,1 sprechen für einen sehr aktiven Krankheitsverlauf. Bei einer Differenz zum Ausgangswert > 1,2 spricht man von einer deutlichen Verbesserung.

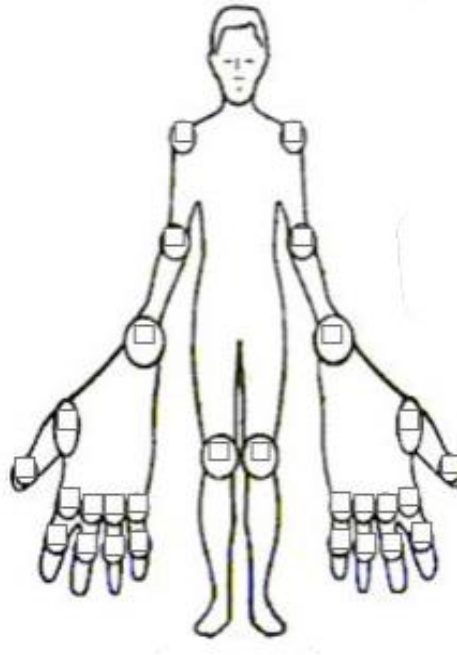


Abbildung 3: Hilfestellung zur Beurteilung der druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenke, die bei RA berücksichtigt werden. (Quelle: Visual DAS28 Calculator Software DAWN; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Piet L. C. M. van Riel und seines Teams).

Drei Jahre nach Ausbruch der RA kann man bei 70 % der Patienten röntgenologische Veränderung in den Gelenken feststellen. Bei über der Hälfte von ihnen findet man schon im ersten Jahr knöcherne Usuren, wobei Füße öfter befallen sind als Handgelenke. Obwohl das Fortschreiten der Gelenksdestruktion mit der Zeit langsamer wird, kommt es schon am Anfang zu starken Funktionseinbußen. Nur bei 20 % der Erkrankten fehlen nach zehn bis zwölf Jahren Deformierungen und die uneingeschränkte Erwerbsfähigkeit bleibt erhalten (Sanmartí et al. 2007).

Neben den Röntgenaufnahmen der Gelenke kann auch eine Sonographie oder die Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden. MRT ist zwar zeit- und kostenintensiver erlaubt aber schon im Frühstadium, wo das konventionelle Röntgen noch Normalbefunde aufweist, die pathologischen Veränderungen in den Knochen, Gelenken und Weichteilen zu erkennen.



Abbildung 4: MRT Aufnahme der rechten Hand eines RA-Patienten im Laufe der Studie mit Handgelenksbeteiligung. Der Patient ist aus der rheumatologischen Sprechstunde des Uniklinikum Göttingen.

Die am häufigsten angewendete Einteilung der RA in Bezug auf die röntgenologischen Veränderungen ist die Klassifikation nach Steinbrocker. Die vier Stadien spiegeln das Fortschreiten der RA in den kleinen Gelenken der Hand sowie im distalen Bereich des Fußes wieder (Steinbrocker et al. 1949).

Tabelle 2: Klassifikation der rheumatoiden Arthritis nach Steinbrocker et al. (1949)

Stadium 1	Keine bis leichte Veränderungen, allenfalls radiologische Anzeichen einer gelenknahen Osteoporose
Stadium 2	Gelenknahe Osteoporose, Gelenkspaltverschmälerung, Erosionen der gelenkbildenden Knochenflächen
Stadium 3	Starke destruktive Veränderungen mit stark ausgeprägten Erosionen; Gelenksdeformation mit Subluxation, ulnare Deviation
Stadium 4	Weit fortgeschrittene destruktive Veränderungen mit knöcherner Deformierung, Gelenkluxationen und – instabilität, Hinzutreten von fibröser oder knöcherner Ankylose



Abbildung 5: Röntgenaufnahme der Hände zur Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit einem fortgeschrittenen Stadium der rheumatoiden Arthritis. Der Patient ist aus der rheumatologischen Sprechstunde des Uniklinikum Göttingen.

Um auch extraartikuläre Manifestationen rechtzeitig zu behandeln, werden unter anderem regelmäßig ein Röntgen-Thorax mit einer Lungenfunktionsuntersuchung und eine Sonographie des Abdomens durchgeführt.

1.1.7 Labordiagnostik

Die Laboruntersuchungen für RA sind umfassend und dienen zur Unterstützung der klinischen Verdachtsdiagnose. Es gibt soweit keinen einzelnen Laborparameter, anhand dessen man die Diagnose der Rheumatoide Arthritis bestätigen oder verwerfen könnte. Außer der Routine-Laboruntersuchungen werden auch spezifische Biomarker wie Rheumafaktor und Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide bestimmt, die die Diagnose erhärten.

Die Rheumafaktoren (RF) sind Autoantikörper verschiedener Subklassen (IgM, IgG, IgA, IgE), die von den Plasmazellen gebildet werden und sich gegen das Fc-Fragment des Immunglobulins Klasse G (IgG) richten. Sie gehören hauptsächlich zur IgM-Klasse und können im Serum oder in der Synovialflüssigkeit mithilfe von ELISA, Hämagglutinationstest oder Waaler-Rose-Test nachgewiesen werden. Waaler E. entdeckte 1940, dass der Rheumafaktor (RF) bei vielen Patienten mit rheumatoider Arthritis und anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis positiv ist. Es war einer der ersten Antikörper, der in der Diagnostik der RA eingesetzt wurde und dazu diente eine klinisch-

laboratorische Unterscheidung zwischen seropositiver und seronegativer RA zu machen. Bei einem Wert über 20 IU/ml spricht man von einer seropositiven RA.

Bei der rheumatoiden Arthritis hat der RF eine hohe Sensibilität und wird bei 60 bis 80 % der Patienten nachgewiesen. Im Frühstadium der RA kommt der RF nur bei 25 % der Erkrankten vor, was seine Bedeutung in der Frühdiagnostik deutlich vermindert. Eine einmalige Bestimmung in der Frühphase mit einem negativen Ergebnis ist nicht ausreichend, um eine seropositive RA auszuschließen. Bei einem Verdacht auf RA oder einer bestätigten Diagnose sollte der RF alle sechs bis zwölf Monate wiederholt bestimmt werden, da diese Zeit für eine Erneuerung des Plasmazellpools notwendig ist. Liegt gleich ein positives Ergebnis vor, kann auf eine erneute Bestimmung verzichtet werden, da eine Titerveränderung mit der Krankheitsaktivität im Gegensatz zu BSG und CRP nicht korreliert. Eine Titersenkung wird möglicherweise durch die Therapie herbeigerufen, was durch den zytostatischen Effekt erklärt werden kann. Jedoch neigen Patienten mit einem hohen Rheumafaktor-Titer zu extraartikulären Manifestationen der RA und zu einem starken destruktiven Geschehen (Saraux et al. 2002).

Außer dem seltenen Auftreten von RF im Frühstadium, weist der Marker noch einen Nachteil der RA Diagnostik mit seiner relativ niedrigen Spezifität von 60 % auf. 5 % der gesunden Bevölkerung weisen einen leicht positiven RF auf, bei über 65-jährigen liegt die Rate über 10 %, hierbei kommt es aber nicht zum klinischen Bild einer rheumatoiden Arthritis. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis steigt jedoch, je höher der Wert ist. Außerdem kann es zu falsch-positiven Werten bei entzündlichen Erkrankungen wie Tuberkulose, bakterielle Endokarditis, Virusinfektionen, Parasitose oder bei malignen Erkrankungen kommen.

In der Frühdiagnostik der RA ist es wichtig neben dem RF auch die Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptid Antigene (anti-CCP) zu bestimmen. Diese Antikörper verfügen über eine hohe Spezifität (über 95 %) und Sensitivität und sind schon vor dem Auftreten klinischer Anzeichen der Erkrankung im Serum nachweisbar. Trotz vieler Studien lässt sich jedoch schlecht vorhersagen, wann es zum Ausbruch der RA bei einem bis dahin klinisch unauffälligen Patienten mit einem positiven Wert für anti-CCP kommt (Rantapää-Dahlqvist et al. 2003).

Das Zielantigen, der in den 70er Jahren entdeckten anti-CCP, ist das Filaggrin, welches von den keratinproduzierenden Epithelzellen exprimiert wird. Anti-CCP gehören zur Familie der citrullinierten Autoantikörper zusammen mit Anti-Keratin-Antikörpern (AKA) und Antikörpern gegen das mutierte citrullinierte Vimentin (MCV). Die MCV-Antikörper gehören auch zu den Biomarkern bei RA und haben einen ähnlichen prognostischen Wert wie anti-CCP. Die Ursache für die Entstehung der citrullinierten Antikörper ist eine Veränderung von Proteinen aufgrund einer entzündlichen

Reaktion in der Synovialmembran bei RA und nachfolgender Citrullinierung dieser. Dadurch verändert sich die Ladung und die Struktur der Proteine und sie werden als körperfremd erkannt (Pruijn et al. 2010).

Anti-CCP sind nicht nur ein früher Biomarker bei RA sondern auch ein Zeichen für einen erosiv destruierenden Verlauf der Erkrankung mit einer schlechten Prognose unabhängig vom Vorhandensein von RF (Nishimura et al. 2007). Anti-CCP Titer korrelieren wie RF nicht mit der Krankheitsaktivität und eignen sich deshalb schlecht als Verlaufsparemeter. Anti-CCP kommt bei Gesunden nicht vor und nur bei 2 bis 3 % der Patienten mit anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis. Aufgrund der Güte als diagnostisches Kriterium wurde anti-CCP in die ACR/EULAR 2010 Klassifikation aufgenommen.

Außer der Biomarker werden bei Patienten mit RA regelmäßig das Blutbild, die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), CRP und die Nierenparameter untersucht. BSG und CRP sind zwar unspezifische Faktoren und sind nicht beweisend für eine RA, korrelieren jedoch mit der Krankheitsaktivität. Sie können gut als Verlaufsparemeter eingesetzt werden, um z. B. das Ansprechen auf eine Therapie zu kontrollieren (Sokka und Pincus 2009).

Bei einer langandauernden aktiven Erkrankungsphase kommt es meist zu einer Veränderung des Blutbildes mit Zeichen einer Entzündungsanämie begleitet von einer Thrombozytose. Außerdem führt man eine Urindiagnostik durch, die zum Ausschluss extraartikulärer Manifestation und zur Kontrolle möglicher Schädigungen hervorgerufen durch die antirheumatische Therapie, dienen soll.

1.1.8 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Die Behandlung der RA beinhaltet medikamentöse, physiotherapeutische und chirurgisch-orthopädische Maßnahmen. Das Ziel der Therapie ist ein Sistieren der Symptomatik und eine mögliche Remission, Aufhalten der Gelenkszerstörung und Funktionalitätserhalt mit einer verbesserten Lebensqualität.

Aktuelle Studien zeigen, dass der sehr frühzeitige Beginn (VERA *very early rheumatoid arthritis*) einer immunsuppressiven Therapie insbesondere mit Methotrexat zu einer vollständigen Remission der Erkrankung führt und somit auch in manchen Fällen die Möglichkeit die Therapie vollständig abzusetzen besteht. Dieses „*hit hard and early*“ Prinzip hat zu einem vollständigen Umdenken in der Rheumatologie geführt. Früher wurde die Therapie mild begonnen und im weiteren Verlauf eskaliert. Jetzt möchte man die Erkrankung eher initial aggressiv therapieren, in Remission bringen und eine milde Dauertherapie anstreben. In den meisten Fällen kann erreicht werden, dass keine röntgenologischen Veränderungen an den Gelenken im Krankheitsverlauf entstehen.

Ausgehend von der Pathogenese der RA, gibt es zwei Angriffspunkte der medikamentösen Therapie: die Immunsuppression und die Hemmung der Entzündungsmediatoren, vor allem von Prostaglandinen.

Zur Immunsuppression werden bei RA *disease-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARD), Biologika und Glukokortikoide eingesetzt. Diese Therapeutika führen zu einer Verlangsamung der erosiven Gelenkzerstörung und zu einer möglichen Remission. Der Wirkungseintritt ist jedoch je nach Medikamentengruppe bis zu einigen Monaten verzögert (Svensson et al. 2005). Glukokortikoide haben außer der immunsuppressiven auch eine entzündungshemmende Wirkung, genauso wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR). Bei alleiniger Gabe kommt es innerhalb von einigen Stunden zur Schmerzlinderung und zu einer verbesserten Beweglichkeit. Die Remission und die gelenkprotektive Wirkung bleiben jedoch aus.

Nichtmedikamentöse Therapien (Physiotherapie, vegetarische Diät, Akupunktur, Sport usw.) sind alleinig nicht ausreichend um die Krankheitsprogression aufzuhalten, fördern aber ein verbessertes Allgemeinbefinden und Beweglichkeit und haben ein positives Outcome bezüglich des Langzeitkrankheitsverlaufs (Luis Vitetta et al. 2012; Munneke et al. 2004).

Chirurgisch orthopädische Maßnahmen, die von einer Synovektomie bis zur Endoprothetik gehen, sind vor allem den späteren Stadien der RA vorbehalten und dienen vor allem dem Funktionalitätserhalt des Gelenks.

Die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) hat 2012 neue Leitlinien bezüglich der medikamentösen Therapie der RA auf der Grundlage der EULAR Empfehlung herausgebracht (Krüger et al. 2012).

Bei der Diagnosestellung der RA soll sofort eine Therapie mit klassischen DMARDs eingeleitet werden, da im Frühstadium die besten Langzeit-Behandlungsergebnisse erreicht werden können.

Die klassischen DMARD führen zur Immunsuppression, hemmen die Proliferation der Synoviozyten und der Fibroblasten, was sich in den Laborwerten widerspiegelt. Außerdem kommt es zu einem Fortbestehen der klinischen Wirkung auch nach dem Absetzen des Medikaments.

Als Goldstandard wird Methotrexat (MTX) in Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Prednisolon (< 10 mg/Tag) verschrieben. Es handelt sich bei MTX um einen Folsäure-Antagonisten, der in den Zellstoffwechsel eingreift. Die empfohlene Dosis liegt zwischen 7,5 und 30 mg/Woche und jeder Patient wird individuell eingestellt. Das Präparat wird per os oder subkutan einmal die Woche verabreicht, wobei 24 Stunden später eine einmalige Einnahme von Folsäure empfohlen wird. Trotz gewisser Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität, Mukositis, Magen-Darm-Beschwerden,

kann MTX unter regelmäßiger Kontrolle der Blutwerte und Organfunktionen über Jahre eingenommen werden (Whittle und Hughes 2003). Aufgrund der langsamen Eintrittswirkung kann die Effizienz des Medikamentes in der Monotherapie erst nach zwei bis drei Monaten beurteilt werden. Einige Studien haben gezeigt, daß für ein schnelleres Ansprechen, Prednisolon erst in einer Starthochdosis von 60 mg verabreicht und dann innerhalb weniger Wochen auf den *low-dose-level* reduziert werden soll (Kavanaugh und Wells 2014). Liegt nach dem Ausdosieren ein unzureichendes Ansprechen vor, wird eine Kombinationstherapie mehrerer DMARDs angestrebt. Hierfür kommen zusätzlich zu MTX Leflunomid, Sulfasalazin oder Ciclosporin A infrage.

Ist aufgrund von gewissen Unverträglichkeiten MTX als primäres Basistherapeutikum kontraindiziert, werden andere DMARDs (siehe oben) eingesetzt.

Laut DGRh sind Biologika erst nach spätestens einem halben Jahr zu empfehlen, wenn die Basistherapie versagt hat, zu messen an der anhaltend hohen Krankheitsaktivität. Bei aggressivem Verlauf der RA oder ungünstigen Prognosefaktoren sollte die Therapie mit Biologika schon zu Anfang erwogen werden. Bleibt diese innerhalb von drei bis sechs Monaten ineffektiv, so sollte man ein anderes Biologikum zur Behandlung einsetzen.

Biologika sind biotechnisch hergestellte Proteine, die je nach ihrer Wirkstoffgruppe gezielt in die Pathogenese der RA eingreifen können und die entsprechenden proinflammatorischen Mediatoren, größtenteils Zytokine, in ihrer Wirkung inhibieren. Ihr Vorteil gegenüber den Basistherapeutika liegt im schnelleren Behandlungseffekt, oft schon innerhalb weniger Tage, und positiven Ansprechen der Erkrankung, wenn die DMARDs-Therapie versagt hat.

Nachteile bei der Therapie mit Biologika sind sehr hohe Kosten und ein erhöhtes Risiko für die Reaktivierung von Infektionskrankheiten. Das Nebenwirkungsprofil ähnelt dem von MTX mit Blutbildveränderungen und Leberfunktionsstörungen. Da es sich bei Biologika um Proteine handelt, kann es selten auch zu schweren Infusionsreaktionen kommen. In sehr seltenen Fällen wurde auch das Auftreten von Lymphomen beobachtet, dies konnte jedoch durch weitere Studien nicht mehr bestätigt werden (Wolfe und Michaud 2007).

Die Wahl des Biologikums ist individuell von der Komorbidität, Begleitmedikation und den Nebenwirkungen abhängig. Hier werden nur die beschrieben, deren Auswirkung auf das kardiovaskuläre System in dieser Studie untersucht wurde.

Für eine verbesserte Wirksamkeit wird es empfohlen Biologika nicht in Monotherapie, sondern mit MTX oder Leflunomid zu verabreichen. Nur Tocilizumab zeigte in Studien gleich gute Effizienz: in Kombination mit MTX und als Monotherapeutikum (Nishimoto et al. 2009).

Zu den Tumornekrosefaktor (TNF)-Blockern zählen u. a. Etanercept, Adalimumab und Infliximab. Beim Etanercept handelt es sich um ein Fusionsprotein, Adalimumab ist ein humoraler monoklonaler Antikörper vom IgG-Typ. Beide sind hochspezifisch für TNF- α , den sie neutralisieren, indem er gehindert wird an die Zellmembranrezeptoren zu binden und eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Etanercept bindet außerdem noch Lymphotoxin (TNF- β). Die Medikamente werden subkutan verabreicht: Adalimumab 40 mg einmal alle zwei Wochen, Etanercept einmal wöchentlich je 50 mg. Bei den TNF α -Blockern wurde beobachtet, dass es zum Wiederaufflammen der latenten Tuberkulose kam. Somit ist vor dem Ansetzen der Therapie ein Test auf Tuberkulose obligat (Papagoras et al. 2009). Spricht der Patient auf den verabreichten TNF α -Blocker nicht an oder verträgt diesen nicht, so kann man entweder auf einen anderen TNF α -Blocker oder ein neues Biologikum wechseln.

Rituximab ist seit Juli 2006 für die Behandlung von RA zugelassen. Hierbei handelt es sich um einen chimären monoklonalen Anti-CD20-Antikörper, der die Aktivität der B-Lymphozyten hemmt. Bekannt eher aus der Behandlung der malignen Lymphome, wurde er inzwischen ein fester Bestandteil in der Therapie der RA nach Versagen der Basismedikamente und TNF α -Blocker. B-Lymphozyten spielen bei RA eine wichtige Rolle. Sie produzieren unter anderem den Rheumafaktor und haben desweiteren regulatorische Funktion in der frühen immunologischen Reaktion (Tuscano und Sands 2009). Rituximab bewirkt eine B-Zell-Depletion über Apoptose, komplementabhängige B-Zell-Lyse und antikörperabhängige zellinduzierte Zytotoxizität (Manches et al. 2003).

Rituximab wird als Infusion über vier Stunden verabreicht, nach neuen Therapieprotokollen ist auch eine Infusion über zwei Stunden möglich. Im Abstand von 14 Tagen erfolgen zwei Infusionen je 1000 mg. Eine erneute Gabe kann frühestens nach 16 Wochen erfolgen, normalerweise aber im Abstand von sechs bis zwölf Monaten. Als eine mögliche ernste Nebenwirkung ist das *cytokine release syndrome* zu erwähnen. Hierbei kommt es beim Binden der Antikörper an die B-Zellrezeptoren zu einer Aktivierung der B-Zellen und zu einer Freisetzung von Zytokinen, was eine Art systemischer Entzündungsreaktion mit Blutdruckabfall, Fieber und Schüttelfrost entspricht. Als Prophylaxe werden vor der Infusion 100 mg Prednisolon i. v., Antihistaminika und NSAR gegeben (Kulkarni und Kasi 2012).

Interleukin-6 (IL-6) ist ein weiterer möglicher Angriffspunkt bei der RA. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit vielseitiger physiologischer Wirkung. Es reguliert unter anderem die Immunreaktion, die Synthese von Akut-Phase-Proteinen, Knochenstoffwechsel und Hämatopoese. In den Gelenken der RA-Patienten produzieren Synoviozyten und Makrophagen vermehrt IL-6, welches die Sekretion von Immunglobulinen aus B-Lymphozyten hervorruft und T-Zellen aktiviert. Tocilizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der sich gegen den IL-6-Rezeptor richtet und die Aktivität von IL-6 blockiert. Tocilizumab wird alle vier Wochen als Infusion verabreicht in einer Dosierung von

8 mg/kg Körpergewicht (Patel und Moreland 2010). Mittlerweile existiert auch die Möglichkeit einer subkutanen Gabe einmal in der Woche.

Studien haben eine Risikominderung für kardiovaskuläre Erkrankungen bei RA-Patienten, die mit DMARDs behandelt wurden, gezeigt. Solch eine Wirkung ist vor allem bei MTX bekannt und ist auch schon mehrmals untersucht worden (van Halm et al. 2006b).

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Studien über die TNF α -Blocker. Diese Biologika führen aufgrund ihrer anitnflammatorischen Wirkung zu einer Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse und zu einer weniger ausgeprägten Atherosklerose (Avouac und Allanore 2008).

Bei Tocilizumab und Rituximab gibt es keine ausreichende Studienlage bezüglich deren Auswirkung auf das atherosklerotische Risiko. Dies wird der Schwerpunkt dieser Forschungsarbeit.

1.2 Kardiovaskuläres Risiko bei rheumatoider Arthritis

Die verbesserte medikamentöse Therapie der Grunderkrankung mit Verhinderung der radiologischen Progression und Erhalt der Arbeitsfähigkeit und Lebensqualität führt jetzt zu einer Veränderung des Risikoprofils der Erkrankung. Eine der führenden Ursachen für eine verminderte Lebenserwartung bei RA sind kardiovaskuläre Erkrankungen. Diese umfassen neben Perikarditis, Vaskulitis der Koronargefäße und Befall der Herzklappen auch eine akzelerierte Arteriosklerose.

Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze bezüglich der rheumatoiden Arthritis und der schnellen Entwicklung einer Atherosklerose. Neben den traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren (Alter, Nikotinabusus, Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, positive Familienanamnese und das männliche Geschlecht) zählen dazu Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie (NSAR, Glucocorticoide, Basistherapeutika usw.), mangelnde Prophylaxe der kardiovaskulären Folgen, vor allem aber die gemeinsamen immun-entzündlichen Prozesse, die der Pathogenese der RA und der Atherosklerose zugrunde liegen (Manzi und Wasko 2000).

Atherosklerose ist eine chronische langsam fortschreitende Erkrankung der Arterien vom elastischen und muskulär-elastischen Typ. Es gibt zwei führende Hypothesen über die Entstehung der Atherosklerose. Bei der *Response-to-injury-theory* wird vermutet, wie der Name schon sagt, dass aufgrund einer Intimaverletzung, sei es durch Hypertonie, Infekte, Antigen-Antikörperreaktion, es zu einer Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt und zur nachfolgenden Intimaproliferation mit einer Einlagerung von Lipiden und Bildung von Plaque um eingewanderte Monozyten (= Schaumzellen). Hierbei geht es um eine primäre Störung der Schutzfunktion des Endothels und deren Mediatoren (Ross und Glomset 1976). Die *Lipoprotein-induced-athero-sclerosis-theory* beruht auf einer Oxidierung von *low-density-lipoprotein* (LDL), die zu einer

Chemotaxis von Leukozyten führt. Die, in die Intima, eingewanderten Monozyten werden zu Schaumzellen durch Aufnahme von LDL und verursachen eine Entzündungsreaktion (Goldstein und Brown 1977). Ab hier ist der weitere Verlauf der Pathogenese für beide Hypothesen identisch. Die Entzündung kann auch auf die Media übergreifen, es kommt zu einer Atrophie des muskulären und elastischen Gewebes und zum bindegewebsartigen Umbau. Aufgrund der Bindegewebswucherung und der Kalzifikation der Arterienwand verliert sie ihre Elastizität und verhärtet sich. Außerdem kommt es zu einer Lumeneinengung, da Schäden am instabilen atherosklerotischen Plaque eine Blutgerinnungskaskade auslösen und somit zur Bildung von Thromben führen können (Ross 1999).

Maradit-Kremers et al. (2005a) untersuchten in ihrer Studie die Häufigkeiten der kardiovaskulären Erkrankungen, die auf Atherosklerose beruhen, vor und nach dem Ausbruch der RA. Unter anderem wurde auch ein Risikoanstieg für Myokardinfarkt (MI), vor allem eines asymptomatischen, noch vor der klinischen Ausprägung einer RA, festgestellt. Erwähnenswert ist, dass asymptomatische und somit unerkannte MI etwa 30 % aller MI bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und einer chronischen Niereninsuffizienz ausmachen.

Eine andere Studie der gleichen Forschungsgruppe zeigte einen Zusammenhang zwischen der Schwere der entzündlichen Systemerkrankung und der Letalität, hervorgerufen durch kardiovaskuläre Erkrankungen. Die hohe Aktivität der Systemerkrankung wurde durch eine dauerhafte BSG Erhöhung (> 60 mm/h, *Hazard Ratio* (HR) = 2,03), Rheumatoide Vaskulitis (HR = 2,41) und Lungenbefall bei RA (HR = 2,32) definiert (Maradit-Kremers et al. 2005b).

Unter den kardiovaskulären Risikofaktoren spielt das Rauchen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Atherosklerose und RA. Anhand einer populationsbezogenen Studie (256000 Studienteilnehmer im Alter 45-75 Jahre) wurde nachgewiesen, dass das Rauchen die Entstehung einer Anti-CCP positiven RA teils auch bei genetischer Disposition fördert. (Goodson et al. 2004).

Die Lipidparameter bei RA weisen ähnliche Veränderungen wie auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen auf, z. B. durch einen Abfall des *high-density lipoprotein* (HDL). Außerdem korrelieren sie mit der Krankheitsaktivität und somit einer Erhöhung der BSG und CRP (Choy und Sattar 2009). In den Arterien sorgt HDL für eine Rückführung des Cholesterins aus der Intima und verhindert somit bis zu einem gewissen Grad eine Entwicklung von Atherosklerose. Dennoch sind Lipide bei aktiver Erkrankung häufig paradox vermindert und sollten nur während der inaktiven Erkrankung bestimmt werden.

In den letzten Jahren sind immunologische Marker der Atherosklerose in den Vordergrund gerückt. Dazu zählen die Akute-Phase-Proteine (CRP), Faktoren der Immunaktivierung (proinflammatorische Zytokine), Dysfunktion des Endothels (zelluläre Adhäsionsmoleküle, von-Willebrand-Faktor) und

Immunkomplexe. Viele davon sind einerseits Vorboten der kardiovaskulären Erkrankung, andererseits spiegeln sie den entzündlichen Prozess der RA wider (Szmitko et al. 2003a, Szmitko et al. 2003b). Ihre Diagnostik spielt eine wichtige Rolle, da die Hälfte der RA-Patienten mit kardiovaskulären Komplikationen keine „traditionellen“ Risikofaktoren aufweisen. Somit können eine CRP-Erhöhung und ggf. atherogene Lipidwerte bei RA-Erkrankten einen möglichen Hinweis auf eine spätere Manifestation der Atherosklerose liefern (van Halm et al. 2006a).

Die arterielle Hypertonie ist die häufigste Komorbidität bei RA. Dies ist zumeist durch die Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Glucocorticosteroiden bedingt. Beide Medikamentengruppen regulieren die Wasser- und Natriumausscheidung im Körper. Es kommt zu einem Anstieg des Gesamtkörperwasservolumens mit nachfolgendem Anstieg des Blutdruckes. Dies ist wiederum ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Atherosklerose (Souverein et al. 2004). Weitere unerwünschte Nebenwirkungen der Glucocorticoide sind Störungen des Insulinstoffwechsels und des Gewichts was auch zu den „traditionellen“ Risikofaktoren zählt (Dessein und Joffe 2006). Eine andere Studie zeigt jedoch, dass eine Kombinationstherapie aus Glucocorticoiden mit den Basistherapeutika zu einer Normalisierung des Gesamtcholesterol/HDL-Quotienten („atherogener Index“) mit einer Aktivitätsminderung der RA führt und somit eine antiatherogene Wirkung hat (Boers et al. 2003).

Eine amerikanische Studie mit 1240 an RA erkrankten Teilnehmern, die in einem Zeitraum von sechs Jahren regelmäßig untersucht wurden, zeigte eine 60 % Reduktion der Mortalitätsrate bei Patienten, die mit Methotrexat (MTX) therapiert wurden im Gegensatz zu denen, die mit anderen Basistherapeutika behandelt wurden. Besonders hervorzuheben sei die Senkung der Letalität kardiovaskulärer Ursache um 70 %. Einerseits verbessert MTX die Mobilität der Patienten, in dem es die entzündlichen Prozesse vermindert (messbar an der Höhe der BSG und CRP-Werte), andererseits greift es wahrscheinlich in die gemeinsame Pathogenese der RA und der Atherosklerose ein und hemmt somit ihr Fortschreiten (Choi et al. 2002).

Ähnliche Beobachtungen machte man auch bei Tumor-Nekrose-Faktor α -Blockern (TNF α -Blocker). Besonders Infliximab zeigte in den Studien eine Reduktion der kardiovaskulären Letalität durch seine direkte Wirkung auf das Endothel. Es hemmt die Zytokinausschüttung aus dem Endothel und führt zur Normalisierung der endothelabhängigen Vasodilatation, was seinerseits mit einer Verbesserung des entzündlichen Geschehens und somit mit der Minderung der Krankheitsaktivität korreliert (Hurlimann et al. 2002). Jedoch darf Infliximab bei Patienten mit Herzinsuffizienz nur mit größter Vorsicht angewandt werden, da es zu einer kardialen Dekompensation führen kann.

Die heutige Datenlage erlaubt jedoch noch keine Rückschlüsse auf die atherogene Wirkung der neuen Medikamente wie z. B. Tocilizumab (Antikörper gegen Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptor) oder Rituximab (Anti-CD20-Antikörper).

Bei RA ist die Wahrscheinlichkeit eines atherosklerotischen Befalls der Gefäße eng mit der Pathogenese der Erkrankung verflochten. Die antiinflammatorische Therapie erlaubt eine gewisse Kontrolle über die Gelenkdestruktion, unterdrückt jedoch nicht ausreichend den systemischen Entzündungsprozess. Somit ist eine frühzeitige Diagnostik und Behandlung von hoher Wichtigkeit. EULAR hat Richtlinien verfasst bezüglich des Vorbeugens und der Therapie der kardiovaskulären Komplikationen bei RA (Peters et al. 2010).

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen von vier der am häufigsten gebräuchlichen Medikamentengruppen auf die Atherosklerose bei RA-Patienten genauer erforscht werden. Mittels Pulswellengeschwindigkeit (PWV) und Augmentationsindex (AIx) soll versucht werden eine erhöhte arterielle Gefäßsteifigkeit nachzuweisen, wie sie des Öfteren laut Studien bei RA-Patienten vorzufinden ist.

1.3 Endotheliale Vorläuferzellen

Die endothelialen Vorläuferzellen, auch als „*endothelial progenitor cells*“ (EPCs) bekannt, sind das Thema vieler Publikationen geworden, da sie eine wichtige Rolle bei der Regeneration des Endothels und der postnatalen Neoangiogenese spielen. Asahara und sein Team (1997) isolierten als erste die im peripheren Blut zirkulierende CD34⁺, die sich *in vitro* zu Endothelzellen ausdifferenzieren und *in vivo* zur Neoangiogenese nach kardiovaskulären Ereignissen beitragen. Diese Zellen haben eine funktionelle sowie phänotypische Ähnlichkeit mit embryonalen Angioblasten (Asahara et al. 1997).

Die im peripheren Blut zirkulierenden EPCs stammen ursprünglich aus dem Knochenmark von den hämatopoetischen Stammzellen ab. Sie verfügen über Stammzeleigenschaften, können sich jedoch nur in eine bestimmte Zelllinie differenzieren.

Durch unterschiedliche endogene und exogene Einflussfaktoren können die endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden und anschließend an den Ort des Geschehens wandern. Die Mobilisierung kann aufgrund eines entzündlichen Vorganges durch Freisetzung von G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) oder GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*), eines ischämischen Ereignisses durch Sekretion von SDF-1 oder auch durch Hormone (z. B. Erythropoetin) und Wachstumshormone wie VEGF und Angiopoietin hervorgerufen werden (Powell et al. 2005; Moore et al. 2001).

1.3.1 Heterogenität der EPCs

Die gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der EPCs sind einerseits die Identifikation der hämatopoetischen Marker - durch Stammzelloberflächenmarker wie CD34⁺, CD133⁺ und/ oder der Endothelzellmarker KDR/VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor/ vascular endothelial growth factor receptor 2*) - und andererseits die Beurteilung der Stammzellfunktion mithilfe der koloniebildenden Zellen (EPC-CFU; *colony forming units*). Die phänotypische Bestimmung anhand der Oberflächenproteine ist erschwert, da diese bei vielen Zellreihen vorkommen und es somit kein einheitliches spezifisches Oberflächenexpressionsprofil gibt. Außerdem ändern sich die Marker je nach Reifegrad der EPCs. Um eine genauere Aussage treffen zu können, ob es sich um EPCs handelt, werden die Marker in Kombinationen ausgewertet (Urbich und Dimmeler 2004). Außerdem kann man zur Identifizierung die Fähigkeit der EPCs zur Aufnahme von acetyliertem LDL (acLDL) und die Anfärbbarkeit mit Ulex Lectin hinzuziehen (Rehman et al. 2003).

Zahlreiche Studien beschreiben eine Vielzahl von EPCs Subpopulationen, die aus den im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen isoliert werden. Hierbei spielt die Zeit und vor allem das Kultivierungsmedium eine entscheidende Rolle. „*Early outgrowth*“ EPCs bilden Kolonien aus heterogenen spindelförmigen Zellen in einem Fibronectin- und Gefäßwachstumsfaktor angereichertem Medium schon innerhalb einiger Tage. Diese Vorläuferzellen exprimieren viele Marker an ihrer Oberfläche und sezernieren angiogene Zytokine. Obgleich diese Zellen ein niedriges Proliferationspotential haben, verfügen sie über Oberflächenmarker von Makrophagen und sind auch imstande Bakterien aufzunehmen, was auf einen hämatopoetischen Ursprung hindeutet.

Im Gegensatz dazu sind die „*late outgrowth*“ EPCs (OEC) hoch proliferativ, exprimieren Endothelzellmarker, die keinen hämatopoetischen oder monozytären Charakter aufweisen. Sie sind imstande, Kapillaren zu bilden und in vivo gespritzt, Endothel bei geschädigten Gefäßen wieder aufzubauen. Sie bilden erst nach zwei bis drei Wochen homogene kopfsteinpflasterartige Kolonien (Stroncek et al. 2009).

Obwohl die OECs als „wahre“ EPCs bezeichnet werden und einen direkten Effekt haben, entfalten die frühen EPCs ihre Wirkung über Zytokinausschüttung wie VEGF und IL-6. Diese beiden Zytokine steigern die Endothelproliferation, stimulieren die OECs und die frühen EPCs autokrin und parakrin und führen zu einer erhöhten Sezernierung von Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP), die den Aufbau der Blutgefäße unterstützen (Yoon et al. 2005).

1.3.2 Bedeutung der EPCs in der Diagnostik

EPCs werden als Marker für das kardiovaskuläre Risiko und die Endothelfunktion angesehen. Die Anzahl der zirkulierenden EPCs sinkt bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie

Rauchen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck. Außerdem kommt es zu einer Verminderung der Endothelvorläuferzellen auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und zerebrovaskulären Erkrankungen (Hill et al. 2003). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine seit längerem andauernde Schädigung der Gefäße, eine gestörte Mobilisation der EPCs und ein Erschöpfen der Stammzellreserven.

Vasa et al. (2001b) beschrieben eine Suppression der Migration der EPCs bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung und arterieller Hypertonie, die mit zunehmender Anzahl der Risikofaktoren anstieg. Außerdem haben die mononukleären Zellen, die bei diesen Patienten gewonnen wurden, eine verminderte Bereitschaft zur Neovaskularisation gezeigt. Dieser Zusammenhang ist noch nicht eindeutig geklärt. Am ehesten ist die eingeschränkte Mobilisation der EPCs aus dem Knochenmark durch eine Abschwächung der endothelabhängigen Vasodilatation aufgrund einer verminderten Stickstoffverfügbarkeit bedingt. Dafür ist die Kumulation der freien Sauerstoffradikale, die die Proliferation und die Apoptose der EPCs beeinflussen, verantwortlich (Aicher et al. 2003).

Studien bezüglich antihypertensiver Therapie zeigten, dass sowohl ACE-Hemmer (Ramipril) (Müller et al. 2009) als auch Angiotensin-II-Rezeptorblocker (Olmesartan) (Bahlmann et al. 2005) eine verbesserte Aktivität und einen Anstieg der peripheren EPCs förderten.

Eine Reihe von klinischen Studien befasst sich mit der Implantation/Injektion der mononukleären Zellen bzw. der EPCs in das vorgeschädigte Gewebe um eine Revaskularisation zu erreichen. Es gibt unterschiedliche Methoden von der Transplantation der EPCs in das ischämische Gewebe (Kalka et al. 2000), über das Verabreichen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur EPC Mobilisation (Asahara et al. 1999) bis zur Knochenmarksaspiration mit Leukopherese.

Niedrige EPC-Werte sind ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und Letalität (Werner et al. 2005). Es ist bewiesen, dass ein Herzinfarkt zu einem Anstieg der EPC-Zahl führt und somit eine Neovaskularisation und eine Minderung des ischämisch geschädigten Gewebes unterstützt (Sobrino et al. 2007).

Eine Dysbalance zwischen der Schädigung und der Regenerationsfähigkeit der Gefäßwand führt zur Entwicklung einer Atherosklerose. Die Unterdrückung der EPC-Aktivität kann einer der Gründe für die Entstehung und die Progression der atherosklerotischen Erkrankungen unter dem Einfluss von Risikofaktoren sein.

1.3.3 EPC in der rheumatoiden Arthritis

Aufgrund der sich zum Teil überschneidenden Elementen in der Pathogenese der Atherosklerose und der RA und einer häufigen Komorbidität führten einige Forschungsgruppen Studien zum Verhalten von EPCs bei Erkrankten an RA durch.

Die meisten Studiengruppen untersuchten EPC oder *colony forming units* (EPC-CFU) und kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Einige zeigten erniedrigte EPC-Werte, andere erhöhte an.

Grisar et al. (2005; 2007) haben die Auswirkung der rheumatischen Erkrankung auf EPCs und EPC-CFU untersucht. Sie haben eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anzahl der EPCs festgestellt. Bei einem aktiven Verlauf kam es zu einem Abfall der EPCs, wobei sich die EPC-Werte bei Krankheitsinaktivität und einer adäquaten Therapie normalisierten.

Jodon de Villeroché et al. (2010) haben sich auf die *late outgrowth* EPC fokussiert und haben eine positive Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität, gemessen anhand des DAS28, und den EPCs festgestellt. RA-Patienten wiesen eine höhere Anzahl an peripheren EPCs im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe auf. Patienten, die sich in der Remission befanden, hatten niedrigere Werte. Außerdem konnten sie keinen Zusammenhang zwischen den Entzündungsmarkern, bzw. Synovitis und den EPCs aufzeigen.

1.4 Wachstumsfaktoren in RA und Atherosklerose

1.4.1 VEGF

Eine unabdingbare Bedingung für die Pannusbildung und sein invasives Wachstum in den Knorpel und Knochen bei RA-Patienten ist die Angiogenese (Koch 2000). Bei der Angiogenese handelt es sich um die Bildung von neuen Mikrokapillaren aus den Vorläufergefäßen. Dies ist ein physiologischer Prozess in der neonatalen Periode und ist eher ein pathologischer Vorgang im Erwachsenenalter mit einigen Ausnahmen wie der weibliche Zyklus und die Wundheilung. Atherosklerose, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Ulcus Erkrankungen, diabetische Retinopathie, Tumore, Kollateralenbildung bei Herzinfarkten sind die prägnantesten Beispiele für die Angiogenese im ausgewachsenen Organismus (Folkman 1995).

Bei RA findet die Endothelproliferation in der Synovia statt und die neuentstandenen Gefäße bestehen vor allem aus der Endothelschicht. Die Gefäßproliferation läuft ausschließlich im Gewebe der entzündeten Gelenke ab.

Bei RA-Patienten herrscht eine lokale Hypoxie der Synovialmembran vor. Dies wirkt sich als ein Stimulus auf die Vaskularisation aus und führt somit zu einer verstärkten Sekretion der Gefäß-

wachstumsfaktoren und Zytokine (Akhavani et al. 2009). Außerdem kommt es in der Synovialmembran zu einer verminderten Expressierung des Tumorsuppressorgens p53, welches die Transkription von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) inhibiert. Die Mutation im p53 ruft eine unkontrollierte Zellproliferation und Neoangiogenese hervor (Angelo und Kurzrock 2007).

Zu den angiogenesefördernden Stimulatoren zählen Gefäßwachstumsfaktoren, die ähnlich wie Hormone über ein breites Spektrum an biologischen Wirkungen auf die Zellen verfügen. Sie können induzierend oder inhibierend auf die Mitogenese, Chemotaxis, Zelldifferenzierung wirken. Sie entfalten ihre Wirkung autokrin oder parakrin. Dazu zählen außer VEGF, Angiopoetin-1 (Ang1), Angiopoetin-2 (Ang2), *fibroblast growth factor* (FGF) und *placenta growth factor* (PGF) (Ferrara et al. 2003).

VEGF ist ein multifunktionales Signalmolekül, das parakrin an der physiologischen und pathologischen Angiogenese durch Stimulation der Endothelzellproliferation teilnimmt. Es wird von Makrophagen, Fibroblasten, Lymphozyten, Osteoblasten und Synoviozyten bei RA-Patienten sezerniert. VEGF wurde in Ovarien, Plazenta, Nieren, Serum und der Synovialflüssigkeit nachgewiesen. Es nimmt eine zentrale Rolle in der Angiogenese bei RA wahr und hat im Gegensatz zu anderen Faktoren einen mitogenen Effekt ausschließlich auf die Endothelzellen (Asahara et al. 1999).

Die VEGF-Konzentration im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ist signifikant höher als bei anderen Erkrankungen aus dem arthritischen Formenkreis und bei der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem erhöht VEGF die Permeabilität der Gefäße und zeigte in einem Tierexperiment eine proinflammatorische Wirkung auf die Gelenke (Yoo et al. 2008). Der VEGF-Spiegel korreliert positiv mit der Krankheitsaktivität und der Gelenksdestruktion bei RA (Lee et al. 2001). Entsprechend der Studie von Ballara et al. (2001) war eine Besserung der klinischen Symptome mit einem Abfall der VEGF-Serumkonzentration assoziiert (Ballara et al. 2001).

Die proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α induzieren die Sekretion von VEGF. So führt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 Rezeptoren zu einer Inhibierung der Synthese von VEGF durch Fibroblasten (Nakahara et al. 2003).

In tierexperimentellen Studien führte eine Unterdrückung von VEGF zu einem Sistieren der Neoangiogenese und des Tumorwachstums.

1.4.2 Angiopoetin

Angiopoetine (Ang) sind Glykoproteine, die die Angiogenese, Bildung von Lymphgefäßen und die Gefäßpermeabilität steuern. Es gibt vier Subtypen, wobei Ang-1 und Ang-2 am besten erforscht sind. Angiopoetin-1 wird in der Frühentwicklung vom Myokard, im Erwachsenenalter von den

perivaskulären Zellen, Perizyten in den Nieren und den Ito-Zellen in der Leber freigesetzt. Ang-2 wird in den Weibel-Palade-Körperchen in den Endothelzellen produziert (Fiedler und Augustin 2006).

Angiopoetine entfalten ihre Wirkung indem sie an den Tyrosinkinase-Rezeptor 2 (Tie-2) binden, eine Phosphorylierung induzieren und somit eine Signalkette auslösen, die die Reifung und die Stabilität der Gefäße während der Angiogenese reguliert. Die Tyrosinkinaserzeptoren werden an der Oberfläche von Makrophagen und Endothelzellen exprimiert. Nur Angiopoetin-1 ist imstande, bei der Bindung mit Tie-2 eine Phosphorylierung zu evozieren, und wirkt somit als ein Agonist in der Angiogenese (Witzenbichler et al. 1998).

Wohingegen die Wirkung von Angiopoetin-2 sehr stark vom Vorhandensein von VEGF abhängig ist. Das Fehlen von VEGF führt zum Untergang von Endothelzellen und der Rückbildung von Gefäßen. Erhöhte Ang-2-Werte begünstigen eine Entzündung, Metastasenbildung und Tumorgefäßneubildung (Eklund und Saharinen 2013). Ang-2 hat ein antagonistisches Potenzial in Bezug auf Ang-1 und inhibiert die Bindung von Ang-1 an Tie-2. Jedoch in der Kombination mit VEGF fördert Ang-2 die Zellproliferation, Migration von Endothelzellen und die Neovaskularisation. Hypoxie, Adrenocorticotropin (ACTH), Glucose und TNF- α verstärken die Produktion von Ang-2 (Woolf et al. 2009).

Zu einer gestörten Induktion der Signalkette kommt es bei Erkrankungen wie Sepsis, Diabetes mellitus, pulmonalen Hypertonie und anderen. Hierbei steigen Ang-1 und Ang-2 Blutspiegel im Serum an. Hohe Spiegel von Ang-2 und Fieber korrelieren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines septischen Schocks (Ricciuto et al. 2011). Jedoch können beide Angiopoetin Typen auch unabhängig voneinander verändert sein.

1.4.3 SDF-1

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) ist ein körpereigener Botenstoff aus der Gruppe der Chemo-kine CXC. Er wurde zum ersten Mal aus dem Knochenmark aus der Bindegewebszelllinie isoliert, wird aber auch in anderen Organen – Lunge, Milz, Leber produziert. Er partizipiert an den physiologischen Prozessen wie Rekrutierung von Stammzellen und deren Mobilisierung zu den Zielorganen während der Organogenese, an der Angiogenese und Wundheilung. Ist aber auch an der Metastasenausbreitung und den Entzündungsgeschehen, solchen wie RA und Atherosklerose beteiligt (McGrath et al. 1999).

SDF-1 entwickelt seine Wirkung bei der Bindung an den CXC4-Rezeptor (CXCR4), der sich an der Oberfläche der hämatopoetischen Stammzellen befindet. Infolgedessen reguliert es die Wanderung der hämatopoetischen Stammzellen zwischen dem peripheren Blut und dem Knochenmark. Es führt außerdem zur verstärkten Proliferation von den CD34⁺-Zellen, die zu den hämato-

poetischen Stammzellen zählen, und deren Mobilisierung, was eine Angiogenese in vivo induziert. Es ist bekannt, dass EPCs CD34⁺ aufweisen und CXCR4 exprimieren und demzufolge auch einer Regulation von SDF-1 unterliegen. Als Therapieoption könnten EPCs bei einem ischämischen Geschehen eingesetzt werden. Um deren Gewinnung zu optimieren, wurde in einigen Studien SDF-1 zusätzlich gespritzt, um eine effektivere Freisetzung und Mobilisierung aus dem Knochenmark zu erreichen. Danach wurden die so gewonnenen EPCs für eine therapeutische Neovaskularisation transplantiert (Yamaguchi et al. 2003).

Bei Entzündungen liegen erhöhte SDF-1-Werte vor. SDF-1 wird bei der RA von den *fibroblast-like*-Synoviozyten (FLS) exprimiert und fördert die Angiogenese sowie den Abbau der Knorpelmatrix durch die Freisetzung von MMP3 aus den Chondrozyten. Außerdem bewirkt SDF-1 eine Migration von CD4⁺-Gedächtniszellen ins Synovium und deren Retention im perivaskulären Gewebe. Zusätzlich stimuliert es eine B-Zell-Akkumulation und die Bildung von Keimzentren, ein typisches Anzeichen für die Synovialitis. Ein Zusammenhang zwischen den SDF-1-Spiegeln und der Krankheitsaktivität, Entzündungsparametern und Gelenksdestruktion konnte in den Studien nicht nachgewiesen werden. Jedoch hatten die RA-Patienten signifikant höhere SDF-1-Blutwerte als die gesunde Kohorte (Mittal et al. 2003).

1.5 Zielsetzung

Die Rheumatoide Arthritis ist eine der häufigsten Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis. Dank vieler Forschungsarbeiten werden immer mehr Fragen bezüglich der Pathogenese und der Ätiologie geklärt und somit ein großer Beitrag zur medikamentösen Therapie geleistet. Je nach Krankheitsgrad und -aktivität gibt es verschiedene Ansätze in der Therapie um eine möglichst frühzeitige Verbesserung der Symptome und eine Hemmung des Krankheitsfortschrittes zu erzielen. Da es sich bei der RA um eine chronische systemische Autoimmunerkrankung handelt, ist ein Augenmerk auf die Organmanifestation und mögliche Folgeerscheinungen zu richten. Außerdem ist zu beachten, dass die eingesetzten Therapeutika wie NSAR, Kortikosteroide, DMARDs und Immunsuppressiva mit vielerlei Nebenwirkungen, von Hauterscheinungen bis zu Tumoren und Atherosklerose mit kardio- und cerebrovaskulären Ereignissen, behaftet sind.

So ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Analyse der Auswirkungen der vier Medikamentengruppen Methotrexat, TNF α -Antikörper (Etanercept und Adalimumab), IL-6-Rezeptor-Antikörper (Tocilizumab) und CD20-Antikörper (Rituximab) auf das mikro- und makrovaskuläre System bei Patienten mit RA im Laufe von sechs Monaten.

Für die Begutachtung des mikrovaskulären Systems werden die koloniebildenden endothelialen Vorläuferzellen (CFU-Hill), die Wachstumsfaktoren und Chemokine VEGF, Angiopoetin-1, Angio-

poetin-2 und SDF-1 hinzugezogen. Hierbei soll das Regenerationspotential der Gefäße unter den jeweiligen Therapeutika untersucht werden.

Die Veränderungen im makrovaskulären System werden anhand der Gefäßsteifigkeit mithilfe von Pulswellengeschwindigkeit (PWV) und Augmentationsindex (AIx) bestimmt.

Es soll der Verlauf der Krankheitsaktivität sowie das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in den jeweiligen Gruppen und beim Vergleich der Gruppen miteinander untersucht werden. Zusätzlich werden spezifische Medikamenteneinnahmen und andere mögliche einflussnehmende Faktoren berücksichtigt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Das Patientenkollektiv, bestehend aus 63 an rheumatoider Arthritis Erkrankten, wurde in der Rheuma- und Nierenambulanz des Universitätsklinikum Göttingen innerhalb eines Zeitraumes von ca. zwölf Monaten erfasst.

Alle an der Studie Teilnehmenden erfüllten die Klassifikationskriterien der ACR/EULAR von 2010.

Die Patienten wurden während ihrer regulären Termine in der Rheumaambulanz bzw. -tagesklinik nach dem Teilnahmeinteresse an der Studie befragt. Nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf, die Gewinnung von Endothelvorläuferzellen, Bestimmung von diversen Laborparametern und die Messung der Gefäßsteifigkeit mittels Tonometrie wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

Die für die vorliegende Arbeit notwendigen Daten wurden sowohl aus den Akten als auch anhand einer ausführlichen Patientenanamnese in Bezug auf aktuelle Beschwerdesymptomatik, Komorbidität, Medikamenteneinnahme und KHK-Risikofaktoren erhoben.

Eine Zustimmung der Ethikkommission (Ethikantragsnummer: 17/2/08) wurde eingeholt.

2.2 Untersuchung der Endothelvorläuferzellen

Nach einer ausführlichen Aufklärung und dem Einholen einer Unterschrift bei der Einverständniserklärung wurde im Rahmen der Routineuntersuchung bei den Probanden Blut abgenommen. Die Untersuchungen der Klinischen Chemie und der Hämatologie wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Göttingen entsprechend den Leitlinien des jeweiligen Instituts durchgeführt. Für die Bestimmung der endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) wurden zusätzlich zwei Lithium-Heparin Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde sowohl bei der ersten als auch bei der nachfolgenden Untersuchung 6 ± 2 Monate später gewonnen. Bei den Patienten, die als Therapie die Biologika Tocilizumab bzw. Rituximab erhielten, fand die Blutabnahme vor der Medikamentenapplikation statt. Das Blut wurde innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet.

Wie bereits im Kapitel 1.3.2 ausgeführt, können EPCs als indirekte Indikatoren eines erhöhten kardiovaskulären Risikos genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden aus der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes so benannte *early endothelial outgrowth cells* (eEOCs/eEPCs) kultiviert. Dies geschah nach einem international vielfältig publizierten Protokoll. Das Verfahren ist in seiner ursprünglichen Form von Hill et al. 2003 entwickelt worden. Die einzelnen Kolonien, die innerhalb von fünf Tagen entstehen, werden als *colony-forming unit-Hill colonies* (CFU-Hill-Kolonien oder CFU-ECs – *Colony Forming Unit-Endothelial Cells*) bezeichnet. Zur Identifizierung

der EPCs wurde eine spezielle Färbung mit Lectin und acetyliertem LDL (acLDL) durchgeführt mit anschließender Zählung der Kolonien unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.2.1 Kultivierung der CFU-Hill-Kolonien

Die Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) und die weiteren Schritte bis zum Auszählen der Kolonien fanden unter sterilen Bedingungen im Labor statt. Für die Gewinnung der EPCs waren ca. 20 ml heparinisiertes Blut notwendig. Das Blut wurde zunächst auf 15 ml Ficoll (Ficoll-Paque™Plus) aufgeschichtet. Es durfte nicht zu einer Vermischung der beiden Flüssigkeiten kommen. Ficoll ist ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, welches für die Isolierung von mononukleären Zellen eingesetzt wird. Es eignet sich zur Dichtegradientenzentrifugation aufgrund seiner hohen molaren Masse. Nach dem Zentrifugieren der Probe bei 1.400 Umdrehungen pro Minute, kam es zu einer Schichtung dieser.

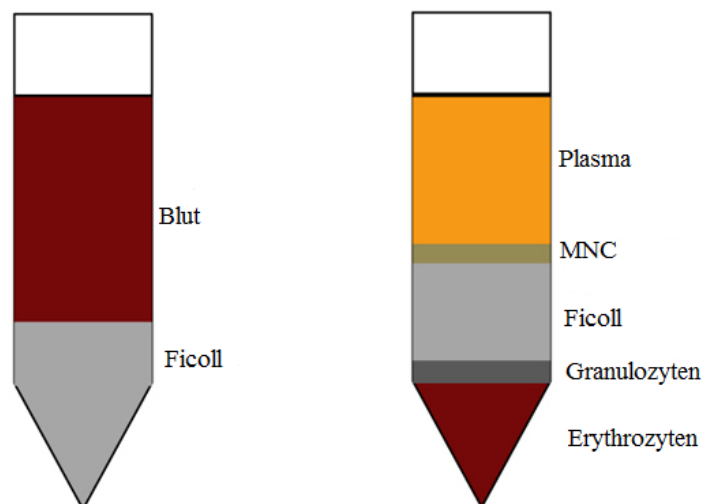


Abbildung 6: Isolierung der MNC mittels Ficoll: vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Das Plasma wurde für ELISA aufgehoben und bei - 20°C eingefroren. Die Monozyten-Lymphozyten-Fraktion wurde abpipettiert und mit 30 ml *phosphate buffer saline* (PBS) gereinigt. PBS ist eine osmotische Pufferlösung, bestehend aus Natrium-, Kaliumchlorid und Phosphat mit einem pH-Wert von 7,4. Da es dem pH im menschlichen Organismus entspricht, wird es gehäuft beispielsweise für die Zellreinigung oder Verdünnungen eingesetzt und gewährleistet immer einen konstanten pH.

Nach einer zehnminütigen Zentrifugation setzte sich am Boden ein Zellpellet ab, das weiter verarbeitet wurde. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde erneut in 30 ml PBS resuspendiert. Mithilfe der standardisierten Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der mononukleären Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in den vier äußeren Eckquadraten (jeweils ein Volumen

von 0,1 μ l) unter dem Mikroskop (Leica®) bei 125-facher Vergrößerung ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet.

Das Aussäen der MNCs fand bei einer Zelldichte von 5×10^6 MNCs gelöst in 2 ml EndoCult® Medium Kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) statt. Hierfür wurde soviel Überstand abgenommen, bis die notwendige Zelldichte erreicht war. Anschließend wurde die Probe zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml EndoCult® Medium resuspendiert. Für die Anlage der Zellkulturen benötigte man zwei, mit 0,1 % Fibronectin beschichtete Platten (BD Biosciences, Rockville, MD, USA). Zunächst die 6-Well und am Tag drei die 24-Well-Platte. Die Platten konnten auch schon im Voraus unter sterilen Bedingungen angefertigt werden und mussten während des gesamten Prozesses steril bleiben. Fibronectin ist ein Glykoprotein aus der extrazellulären Matrix und ist an lebensnotwendigen Prozessen wie Embryogenese, Zellmigration und Gewebereparatur beteiligt.

Als Kontrolle wurden immer zwei Wells mit jeweils 5×10^6 MNCs gelöst in 2 ml EndoCult® Medium angelegt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und > 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach 48 Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen, mitsamt der koloniebildenden Zellen, auf die mit Fibronectin beschichtete 24-Well-Platte übersät. Well 1 zu Well 1, sowohl Well 2 zu Well 2. Die Inkubation wurde für weitere drei Tage fortgesetzt.

Am Tag sechs reiften die Kolonien aus. Die überschüssige Lösung wurde abpipettiert und eine Zählung unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Die CFU-Hill-Kolonien sind definiert als ein zentraler Kern bestehend aus runden Zellen mit in die Peripherie ragenden spindel-förmigen Zellen.

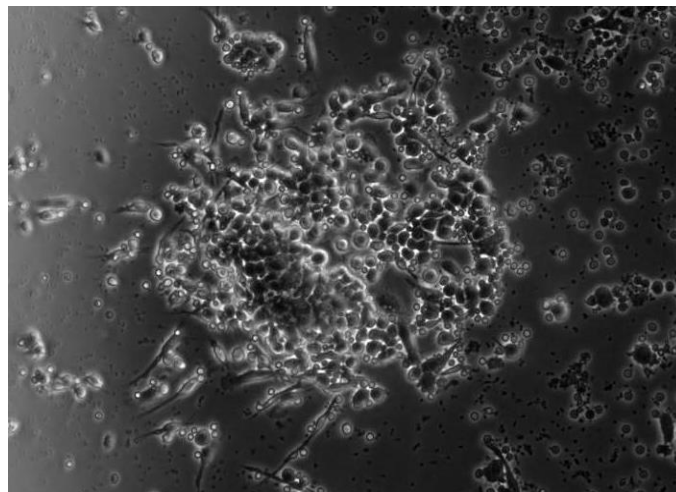


Abbildung 7: CFU-Hill-Kolonie unter dem Lichtmikroskop bei 150-facher Vergrößerung.

2.2.2 Validierung der EPCs mit Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich erfolgte eine Validierung der EPCs mit dem inversen Zellkulturmikroskop Olympus IX-71 (Deutschland GmbH, Hamburg, DE). Hierbei wurde untersucht, ob die Zellkolonien Fluorescein-konjugiertes Ulex Lectin (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) binden und fluoreszenzmarkiertes (Dil) acetyliertes *low density lipoprotein* (AcLDL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aufnehmen können.

Nach Gabe von 2 µl AcLDL gelöst in 200 µl Medium in Well 1 und 2 wurden die Zellen bei 37°C eine Stunde lang inkubiert und anschließend mit 2 % Formaldehyd zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Nach einer Waschung mit PBS, wurden pro Well 5 µl UE-Lectin / 500 µl PBS hinzugefügt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer erneuten Waschung wurden die Zellen vorerst für den nachfolgenden Schritt mit Triton®X 100 0,1 % permeabilisiert. Der Prozess wurde mit 1 % PBS-BSA Lösung gestoppt. Somit wurde die Zellmembran für die Antikörper, die intrazellulär andocken, durchgängig. In Well 1 wurde der unmarkierter *α-smooth-muscle-actin antibody*® (SMA)-rabbit in einer Verdünnung 1 : 100 in PBS hinzugegeben. In Well 2 wurde S100A4 (mouse) Antikörper 4 µl in 1 ml PBS hinzugegeben. Bei S100A4 handelt es sich um ein Calcium-bindendes Protein. Beide Wells inkubierten zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die markierten sekundären Antikörper mit 1 : 500 in beide Wells, vermengt mit 5 µl DAPI (Fluoreszenzfarbstoff), hinzugefügt: in Well 1 jeweils Northern light 637 anti-rabbit (R&D Systems, Inc.) und in Well 2 Northern light 637 anti-mouse (R&D Systems, Inc.). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und abschließender Waschung konnten Zellen, die Dil-AcLDL bzw. UE Lectin gebunden haben mithilfe der Laser Scanning-Mikroskopie mit dem inversen Zellkulturmikroskop Olympus IX-71 unter der Einbeziehung der Emissionsfilter (AHF Analysetechnik, Tübingen, DE) ausgezählt werden.

2.2.3 Materialien zur Bestimmung der EPCs

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte zur EPC-Bestimmung.

Gerät	Hersteller
Kühlschrank	Liebherr
Gefrierschrank	Sanyo
Zentrifuge: Megafuge 1.0R	Heraeus instruments GmbH
Zentrifuge: Rotixa/A	Hettich
Sterilbank Clean Air Typ CA/R	Biohazard
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg

Gerät	Hersteller
Vortex Genie 2	Bodo Schmidt GmbH
Mikroskop: Diavert	Leica Microsystems
CO2 INCUBATOR (Wärmeschrank)	Sanyo
Floureszenzmikroskop IX-71	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien zur EPC-Bestimmung.

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Fibronektin from Human	SIGMA Aldrich Chemie GmbH,	F 0895-1MG
Plasma 0,1 % Solution	Steinheim DE	
Biocoll 1,0777 g/ml	Biochrom AG, Belin	L6115
BSA pH 7.0 1 %	LabClinics SA	K41-001
Endocult Basal Medium	StemCell Technologies Inc	05901
Endocult Supplement	StemCell Technologies Inc	05902
Lectin from Ulex europaeus	SIGMA-ALDRICH	L9006-1MG
Dil AcLDL	Molecular Probes	L3484
Formalin		
PBS pH 7.4	GIBCO	10010-015

Tabelle 5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien zur EPC-Bestimmung.

Material	Hersteller	Katalognummer
diverse Pipetten	Sarstedt AG& Co/ Eppendorf	
diverse Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg	
E-Cup 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030 125.150
50 ml Röhre	Sarstedt AG& Co	62.547.254
24-Well cell Culture Plate	CELLSTAR	662160
MULTIWELL™ 6 well	FALCON	353046
Neubauer Zählkammer	BRAND	

2.2.4 Quantifizierung der Gefäßwachstumsfaktoren

Nicht nur kardiovaskuläre Erkrankungen, sondern auch die rheumatoide Arthritis, haben direkten Einfluss auf die Ausschüttung bzw. Hemmung variabler Gefäßwachstumsfaktoren. Mithilfe von ELISA wurden aus dem Plasma der Studienteilnehmer Wachstums- und Stimulationsfaktoren quantitativ bestimmt. Untersucht wurden *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Angiopoetin-1 (Ang1), Angiopoetin-2 (Ang2), *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1). Das Ziel war, mögliche Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Medikamentengruppen und den Einfluss der Medikamente im Verlauf festzustellen. Somit wurden Plasmaproben zum Zeitpunkt der Patientenrekrutierung und 6 ± 2 Monate später untersucht. Die Testreihe wurde mit kommerziell erwerb- baren ELISA-Kits (alle von R&D Systems, MN, USA) entsprechend der Hersteller-Testbeschreibung durchgeführt.

2.2.5 ELISA

Beim *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) handelt es sich um eine Nachweisreaktion zwischen dem Antigen (dem nachzuweisenden Stoff) und einem spezifischen mit einem Enzym markierten Antikörper. Hierbei kommt es zu einer enzymatischen Farbreaktion. Die Stärke des Farbumschlags steht in direkter positiver Korrelation zur Antigenkonzentration und kann mithilfe eines Photometers erfasst werden. ELISA gehört in die Gruppe der enzymatischen Immunadsorp- tionsverfahren (EIA).

Bei den Testreihen dieser Forschungsarbeit wurde das *sandwich enzyme immunoassay* angewandt. Zum auf die Testreihe ausgelegten monoklonalen Antikörper, der an der festen Phase gebunden ist (96-Well Mikrotiterplatte, vom Testhersteller geliefert), wurden die Standards in verschiedenen Verdünnungen sowie Plasma von Patienten hinzugegeben. Während der zweistündigen Inkuba- tionszeit bei Raumtemperatur kam es zur Bindung des nachzuweisenden Wachstumsfaktors an den ersten Antikörper. Nach einer Waschung der Platte mit einer Pufferlösung zur Entfernung der ungebundenen Bestandteile wurde ein zweiter, in diesem Falle ein enzymgekoppelter spezifischer Antikörper hinzugefügt. Als Markerenzym wurde die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* - HRP) verwendet. Nach erneuter zweistündiger Inkubationszeit und viermaliger Waschung wurde das Substrat-Medium in alle Wells hinzugefügt. Das Medium enthielt Tetramethylbenzidin (TMB) und Hydroperoxid. Nach der Aktivierung durch HRP kam es zu einer Reduktion des TMB und einer Blaufärbung. Da TMB lichtempfindlich ist, wurde die Platte licht- geschützt inkubiert. Schwefelsäure diente anschließend zum Fixieren der Probe. Durch die Zugabe der Stopp-Lösung kam es zu einem Farbumschlag ins gelb.

Die optische Farbintensität musste innerhalb von 30 Minuten nach der Stoppreaktion erfolgen. Die Messung wurde mit einem ELISA-Reader (Tecan) bei 450 nm durchgeführt. Als Referenzwert galt der vom Hersteller vorgegebene Standard, der in einer Verdünnungsreihe angelegt und bei der Messung miterfasst wurde.

2.2.6 ELISA am Beispiel von VEGF

Die Quantifizierung der Gefäßwachstumsfaktoren mittels ELISA wird am Beispiel von VEGF nochmals veranschaulicht. Die Unterschiede in den jeweiligen Tests beziehen sich, außer auf die Zusammensetzung der Reagenzien, ausschließlich auf die Verdünnungsreihe des Standards und die Menge an Plasma. Die Durchführung ist beinahe identisch. Aufgrund der hohen Konzentrationen von manchen Gefäßwachstumsfaktoren im Speichel ist das Tragen eines Mundschutzes empfehlenswert.

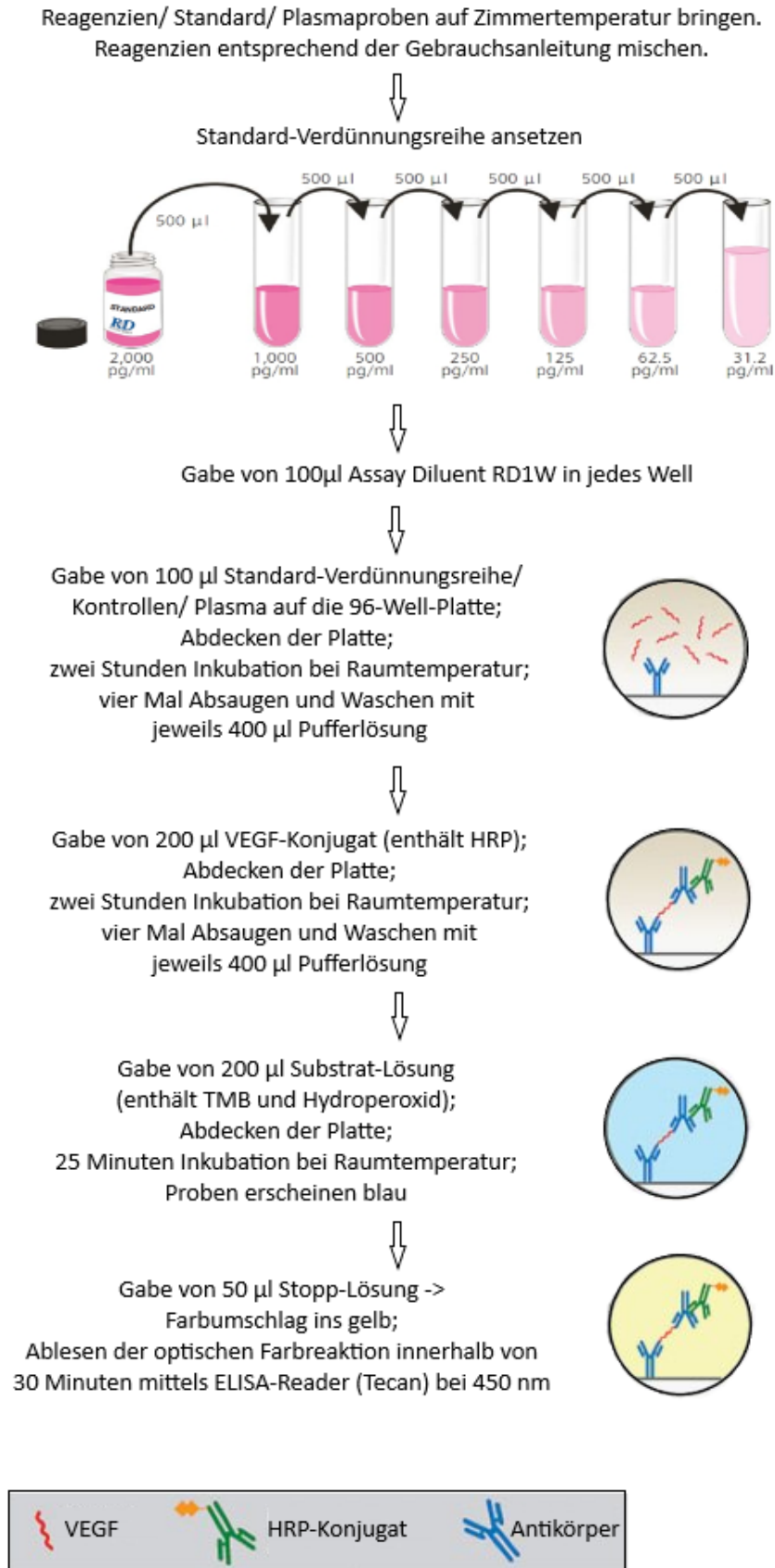


Abbildung 8: ELISA am Beispiel von VEGF (Quelle: Anleitung zum „Quantikine® ELISA Human VEGF; www.RnDSystems.com; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von RnDSystems).

2.2.7 Immunoassays

Tabelle 6: Verwendete Immunoassays zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren und Chemokine.

Name	Hersteller	Katalognummer
Human Angiopoietin-1	R&D Systems	DANG10
Human Angiopoietin-2	R&D Systems	DANG20
Human CXCL12/SDF-1 α	R&D Systems	DSA00
Human VEGF	R&D Systems	DVE00

Tabelle 7: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und weitere Chemikalien zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren und der Chemokine.

Name	Hersteller
destilliertes Wasser	
Folie	
Aluminiumfolie als Lichtschutz	
diverse Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipette	Eppendorf
8-Kanal-Pipette	Eppendorf
Schüttler Rotomax 120	Heidolph
Elisa Reader	Tecan

2.3 Untersuchung des Gefäßstatus

Chronisch entzündliche Erkrankungen haben einen direkten Einfluss auf die Entwicklung einer Atherosklerose und die daraus resultierenden Folgeerkrankungen. Damit steigt das kardiovaskuläre Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko bei vielen Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis. Zur Einschätzung des Schadens am arteriellen System wurden in dieser Forschungsarbeit die Gefäßelastizität und der aortale Blutdruck nichtinvasiv bestimmt. Diese Untersuchungen erfolgten mithilfe des SphygmoCor[®] der Firma AtCore, Australien, im sechsmonatigen Abstand, um mögliche Veränderungen am Gefäßstatus durch die medikamentöse Therapie im Verlauf feststellen zu können.

2.3.1 Pulswellengeschwindigkeit (PWV)

Die Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) ist eine anerkannte Methode und wird von den Europäischen Gesellschaften für Hochdruck (ESH) sowie der Kardiologie (ESC) neben weiteren Untersuchungen zur genaueren Bestimmung der Schädigung des arteriellen Systems herangezogen (McInnes und Schett 2011).

Mithilfe der PWV bestimmt man die Gefäßelastizität, die zum Teil natürlich mit steigendem Alter, aber auch bei Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nierenversagen kontinuierlich abnimmt.

Während der Systole wird Blut aus dem linken Ventrikel des Herzens in die Aorta ascendens transportiert. Hierbei wird sowohl durch die Ventrikelkontraktion als auch durch den Blutausschuss die Aortenwand passiv gedehnt, und es entsteht eine Druckwelle, die sich über das arterielle Gefäßsystem ausbreitet. Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Druckwelle ausbreitet, gibt Aufschluss über die Gefäßelastizität. Aufgrund der hohen Dehnbarkeit einer gesunden Aorta wird der pulsatile Blutfluss, verursacht durch die kardialen Kontraktionen, in eine kontinuierliche Strömung (Windkesselfunktion) umgewandelt und die Pulswellengeschwindigkeit nimmt ab. Bei Alterungsprozessen und Veränderungen an der Gefäßwand steigt die Gefäßsteifigkeit und somit auch die PWV.

Die PWV wird von der Herzfrequenz und dem Blutdruck beeinflusst. Außerdem ist sie von dem Gefäßkaliber und -struktur abhängig. Die Elastizität der Arterien nimmt von proximal nach distal ab. Dies bedeutet, je größer und elastischer das Gefäß, umso langsamer die PWV. In der Aorta beträgt sie zwischen 4 - 6 m/s, in den distalen Arterien vom muskulären Typ 8 - 12 m/s. Laut den Empfehlungen der Fachgesellschaften (ESH / ESC) von 2007 ist eine PWV > 12 m/s pathologisch und birgt somit ein erhöhtes Risiko für einen Endorganschaden.

Als Goldstandard gilt die Messung der Pulsgeschwindigkeit zwischen der rechten Arteria carotis communis und der A. femoralis (cf-PWV), dies ergibt die aortale PWV. Die Aorta ist für die Dämpfung des Blutstroms verantwortlich und somit hat eine Veränderung an der Aortenwand eine direkte Auswirkung auf das Herz (Pereira et al. 2015).

Für die Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit werden die Transitzeit und der „Weg“ benötigt. Die Zeit, die die Pulswelle braucht um von der A. carotis an der A. femoralis anzukommen, wird R-Zacken-getriggert ermittelt. Die Strecke wird an der Körperoberfläche gemessen, wobei beim SphygmorCor® die Subtraktion Jugulum/A. femoralis und Jugulum/A. carotis erfolgt.

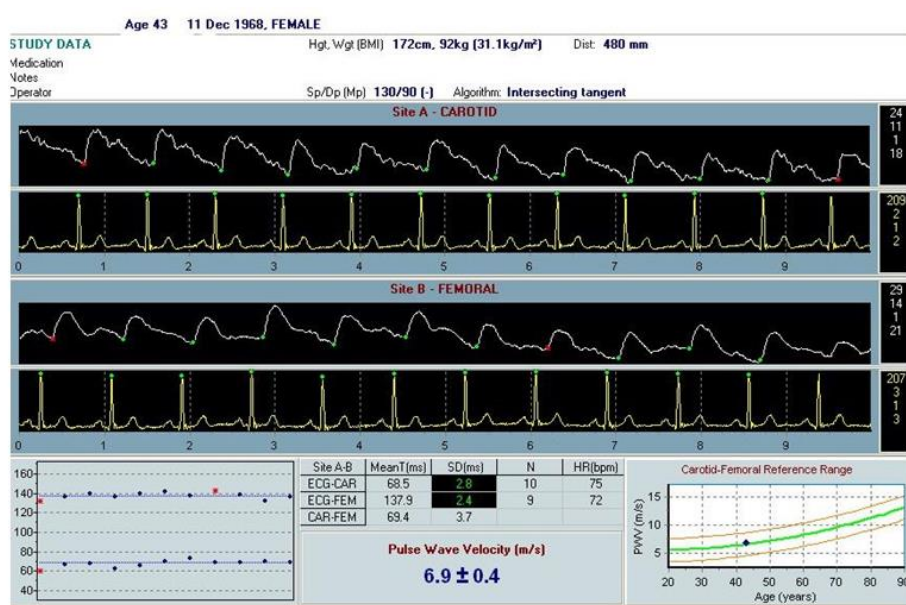


Abbildung 9: Erfassung der PWV mittels SphygmoCor®. Messung erfolgt R-getriggert zwischen der rechten Arteria carotis communis und der A. femoralis (cf-PWV). Die Messung stammt von einem Patienten, der an der Studie teilgenommen hat.

2.3.2 Augmentationsindex (AIx)

Ein wichtiger Bestandteil der PWV ist die Pulswellenreflexion. Diese entsteht an allen Abgängen im arteriellen System und vor allem am Übergang der Arterien in Arteriolen (präkapilläre Widerstandsgefäße). Mit abnehmender Elastizität steigt nicht nur die PWV, sondern es kommt auch zu einem verfrühten Eintreffen der Reflexionswelle zurück in die ascendierende Aorta noch während der Systole. Dies hat zur Folge, dass die Nachlast steigt, die Koronarperfusion gemindert ist und der systolische Druck (SBP) ansteigt. Bei jungen Gesunden trifft die Reflexionswelle erst in der Diastole in die Aorta ascendens ein, der diastolische Druck (DBP) steigt etwas an, was die Koronarperfusion eher fördert.

Die Druckwelle als auch die Reflexionswelle sind am Kurvenverlauf als zwei Gipfel während der Systole erkennbar. Der erste Gipfel (P1) stellt den Blutauswurf aus dem Ventrikel dar. Der zweite Gipfel (P2) ist die Summation der Reflexionswelle und der Pulswelle, nachdem die beiden zusammentreffen. Der Inflektionspunkt ist der Augenblick, in dem die reflektierte Welle in die Aorta ascendens eintritt. Je steifer die Gefäße, desto eher trifft die reflektierte Welle auf die primäre Pulswelle und umso höher erscheint die systolische Pulscurve. Die Druckdifferenz zwischen P2 und P1 wird als *augmentation pressure* (AP) bezeichnet (P2-P1). Bei positivem AP kann man von abnehmender Gefäßelastizität sprechen. Zur besseren Beurteilung wird der Augmentationsindex (AIx) eingesetzt. Er stellt ein Verhältnis zwischen AP und dem Pulsdruck (PP = SBP - DBP) dar.

$$AIx(\%) = \frac{P2 - P1}{SBP - DBP} \times 100 = \frac{AP}{PP} \times 100$$

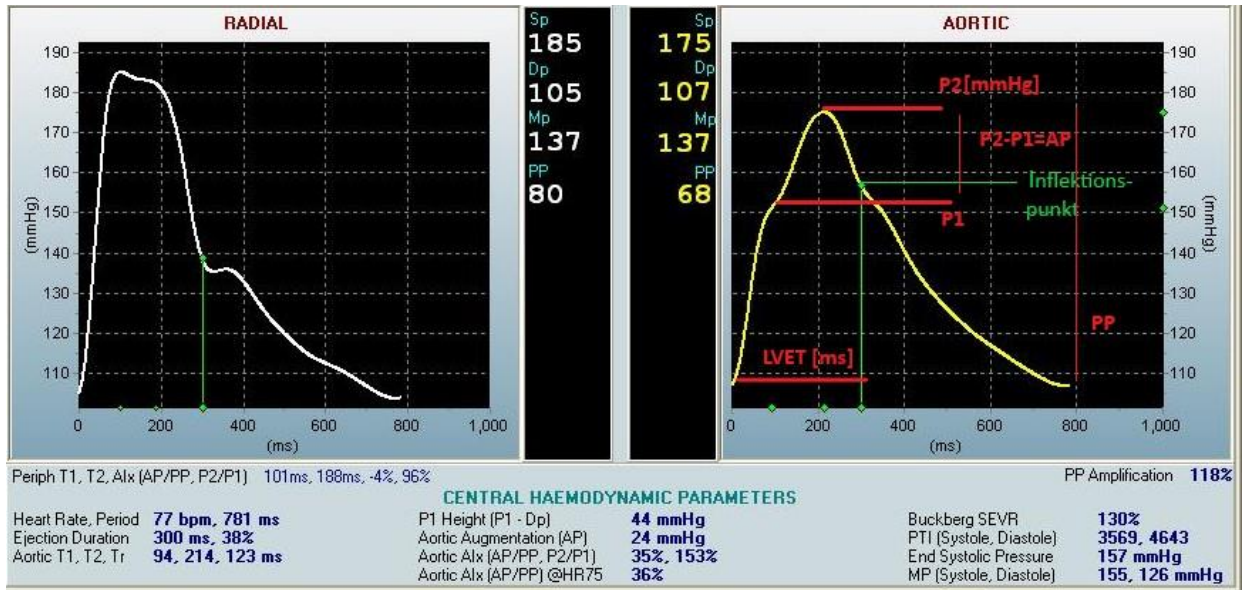


Abbildung 10: Aortale Pulsdruckkurve und Augmentation. Messung mittels Sphygmocor an der A. radialis. Augmentation [mmHg] (P2-P1): Druckanstieg durch die Überlagerung der Ventrikeldruckkurve und der reflektierten Welle; LVET [ms]: linksventrikuläre Austreibungszeit (*Ejection duration*); PP: Blutdruckamplitude (*Pulse pressure*).

Der Alx ist ein wichtiger Parameter in der Beurteilung der Gefäßelastizität. Er erlaubt unter anderem eine genauere Aussage über beispielsweise die Wirkung vasoaktiver Medikamente als die periphere Blutdruckbestimmung oder die PWV.

Der Augmentationsindex unterliegt starker Beeinflussung durch das Alter, Größe, Geschlecht, Herzfrequenz (HF) und Blutdruck. Das während dieser Studie benutzte Gerät SphygmoCor® führt eine Umrechnung für eine HF von 75 Schlägen die Minute (Alx@HR75). Es besteht eine negative Korrelation zwischen HF und Alx. Mit zunehmender HF verkürzt sich die Systole und es kommt zu einer Verlagerung der Reflexionswelle in die Diastole und somit einer verfälschten Darstellung des Gefäßstatus.

Zur Erfassung der Daten für diese Arbeit erfolgte eine tonometrische Messung der Pulscurve mit SphygmoCor®. Hierfür wird die Pulswelle an der A. radialis erfasst und mithilfe der Geräte-Software von der peripheren in die aortale Druckwelle umgerechnet. Mit der Pulswellenanalyse können sowohl der zentraler Blutdruck als auch der AP und der Alx bestimmt werden.

2.3.3 Tonometrische Datenerfassung

Die Messungen wurden bei allen 63 Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, durchgeführt. Es erfolgten jeweils zwei Messungen bei jedem Patienten im Abstand von 6 ± 2 Monaten, um

eine mögliche Veränderung im Gefäßstatus durch die jeweiligen Medikamente feststellen zu können. Bei den Teilnehmern aus der Tocilizumab und Rituximab Gruppen wurden die Daten am Tag der jeweiligen Medikamentenapplikation bestimmt, jedoch vor der Biologika Verabreichung.

Die Messungen fanden in einem ruhigen Raum auf einer automatisch verstellbaren Liege statt. Das weitere Procedere erfolgte nach der Gebrauchsanleitung von SphygmoCor®. Zunächst wurden alle notwendigen allgemeinen Informationen zu den Patienten wie Alter, Gewicht, Größe, Medikamenteneinnahme etc. erfasst und diese in das SphygmoCor® Programm eingetragen. Daraufhin fand die manuelle Blutdruckmessung am Oberarm statt. Dieser Wert wurde ebenfalls im Programm erfasst. Nach einer anschließenden Ausruhpphase von mindestens zwei Minuten erfolgte die Pulswellenanalyse (PWA) im Sitzen statt. Als erstes ertastete man am Handgelenk in Dorsalflexion den stärksten Pulsschlag der A. radialis. Daraufhin wurde das Tonometer mit einem leichten Druck senkrecht auf dem Handgelenk platziert und mindestens zwölf gleichmäßige Wellenformen erfasst. Es erfolgt eine automatische Überprüfung der aufgezeichneten Wellenlinien für die Gewährleistung einer guten Datenqualität und Reproduzierbarkeit dieser. Die Qualität beurteilte man anhand des Operator Index (Werte zwischen 0 - 100), wobei als Richtlinie ein Index ≥ 80 vorliegen musste, um die aufgezeichneten Daten übernehmen zu können.

Mithilfe der PWA wird der zentrale Blutdruck, der AIx, AP, Herzfrequenz und weitere Daten erfasst. Als nächstes wurde die PWV-Messung im Liegen durchgeführt. Hierfür wurden vorerst EKG-Elektroden am Brustkorb in Ableitung II-Konfiguration angebracht. Dies ist notwendig, da die Erfassung der Pulswelle R-getriggert erfolgt. Mit einem Maßband wurde die Distanz in Millimeter sowohl zwischen der Incisura jugularis sterni und der A. carotis als auch zwischen der Incisura jugularis sterni und der A. femoralis gemessen. Diese Daten wurden subtrahiert und in das Programm eingetragen. Somit erfasste man die Strecke, die die Pulswelle zurückgelegt hat. War die EKG-Kurve stabil und stellte die R-Zacke den höchsten Punkt im EKG dar, konnte man mit der Erfassung der PWV beginnen. Das Vorgehen bei der Messung entsprach dem der PWA, mit dem Unterschied, dass hier der Puls an der rechten A. carotis communis und A. femoralis nacheinander erfasst wurde. Hierbei wurde der Peak der R-Zacke als Startpunkt der Druckwelle definiert und anschließend die Zeit gemessen bis die Welle als Pulsschlag an der A. carotis bzw. A. femoralis tonometrisch erfasst werden konnte.

Die PWV wird in Meter pro Sekunde (m/sek) gemessen. Genauso wie bei der PWA gibt es auch bei der PWV Qualitätsmerkmale, die für eine reproduzierbare Messung eingehalten werden müssen. Die Standardabweichung (SD) von der mittleren Zeitdifferenz für jedes der Druck-EKG-Kurvenpaare im gesamten Aufzeichnungszeitraum soll $\leq 10\%$ liegen. Bei Werten über 20% muss die Messung wiederholt werden.

Die Software ermöglicht verschiedene Darstellungen der erfassten Daten auch im Vergleich zu einer gesunden Kohorte. Hierfür liegen Daten vom Gerätehersteller, der eine große Studie an über 10.000 gesunden Probanden verschiedenen Alters durchgeführt hat.

2.4 Framingham/ATP III Risk Score

Das Framingham Risk Score wurde entwickelt, um eine Vorhersage für die Wahrscheinlichkeit ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren zu erleiden, treffen zu können. Anhand der Studie, die in den USA vom *The National Cholesterol Education Program/ Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP III) in den Jahren 1988 bis 1994 an fast 14.000 Probanden im Alter von 20 bis 79 Jahren zur effektiveren Behandlung der Dyslipidämie durchgeführt wurde, wurde der *Framingham Risk Score* modifiziert. Wichtige Faktoren, mithilfe derer man ein Algorithmus zur Berechnung des Risikos entwickelt hat, sind: Alter, Geschlecht, Gesamt-Cholesterol-Spiegel, *high-density-lipoprotein*-Spiegel (HDL), Raucherstatus, systolischer Blutdruck und Einnahme der antihypertensiven Arzneimittel. Allgemein besteht bereits innerhalb von zwei bis drei Jahren vor der Erstdiagnose eine Zunahme des kardiovaskulären Risikos. Da die etablierten Risikokalkulationen bei RA als inakkurat erschienen, kam 2016 eine neue Empfehlung seitens von EULAR. Somit muss bei RA-Patienten das kardiovaskuläre Risiko, berechnet mittels *Framingham score*, mit 1,5 multipliziert werden (Agca et al. 2017).

Es erfolgt eine Einteilung in drei Risikogruppen: < 10 % niedriges Risiko, 10 bis 20 % mittleres Risiko, > 20 % hohes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren. Personen mit einem bereits in der Vergangenheit vorliegenden kardiovaskulären Ereignis oder einem Äquivalent dessen wie Diabetes mellitus, periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK), Aortenaneurysma, Apoplex oder chronische Nierenerkrankung gehören automatisch zur Hochrisikogruppe (Mattace-Raso et al. 2010).

Die Risikoberechnung ist zum Teil entscheidend dafür, ob ein Patient von einer Lebensgewohnheitsänderung wie sportliche Betätigung, Raucherentwöhnung, Ernährungsumstellung, einer medikamentösen Therapie profitiert.

Es gibt mehrere Online-Rechner, die man zur Berechnung heranziehen kann. In dieser Arbeit wurde mit folgendem gearbeitet: <https://www.mdcalc.com/framingham-risk-score-hard-coronary-heart-disease>.

2.5 Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen werden mit IBM SPSS Software (Version 21.0) durchgeführt.

Deskriptive Statistik erfasst das Minimum, das Maximum, den Mittelwert und die Standardabweichung bei den intervallskalierten Variablen und die absoluten sowie relativen Häufigkeiten bei den nominalskalierten Gruppenvariablen.

Die Unterschiedshypothesen werden bei nominalskalierten Variablen mittels Chi-Quadrat-Tests überprüft. Bei intervallskalierten Variablen wird zuerst mit einem Kolmogorov-Smirnov-Test auf die Normalverteilung getestet. Demnach werden die Subgruppen normalverteilter Variablen mit einem t-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Im Falle einer fehlenden Normalverteilung wird der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Normalverteilte intervallskalierte Werte zu Beginn und am Ende der Therapie werden mittels eines t-Tests für verbundene Stichproben miteinander verglichen. Falls keine Normalverteilung gegeben ist, kommt der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Um intervallskalierte Variablen in mehreren Gruppen miteinander zu vergleichen, wird die einfaktorielle Varianzanalyse angewandt (ANOVA). Bei mehreren Zeitpunkten und unter Berücksichtigung zusätzlicher Kovarianten kommt bei nominalen Einflussvariablen (Subgruppen) eine Varianzanalyse mit Messwiederholung, bei intervallskalierten und nominalen Kovariaten, eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) infrage. Bei gegebener Varianzhomogenität wird in den paarweisen Post-Hoc-Vergleichen die Alpha-Fehler-Korrektur nach Bonferroni vorgenommen, bei inhomogenen Varianzen die Games-Howell-Korrektur.

Um die Zusammenhangshypothesen bei den intervallskalierten normalverteilten Variablen zu überprüfen, wird die Korrelation nach Pearson angewandt.

Alle Signifikanztests werden zu einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

An der Studie haben 63 Patienten mit RA teilgenommen, die in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Göttingen vorstellig waren. Es handelte sich um 18 männliche und 45 weibliche Patienten mit einem mittleren Lebensalter von $54 (\pm 13)$ Jahren. Sowohl bei den männlichen (53 ± 12 Jahre) als auch bei den weiblichen Probanden (54 ± 13 Jahre) war das Alter vergleichbar. Die Krankheitsdauer betrug im Mittel 10 ± 9 Jahre (Männer 9 ± 9 Jahre, Frauen 11 ± 9 Jahre). Die Krankheitsaktivität, die mithilfe des DAS28 bestimmt wurde, war bei 29 Patienten (46,8 %) gering, bei 22 Patienten (35,5 %) handelte es sich um einen milden Verlauf und elf Patienten (17,7 %) wiesen eine hohe Aktivität auf. Die Patienten wurden je nach Therapeutika in vier vergleichbar große Gruppen eingeteilt. 17 Patienten (27,0 %) wurden mit MTX behandelt, 15 (23,8 %) erhielten eine anti-TNF α Antikörper (davon acht Adalimumab und sieben Etanercept), 14 (22,2 %) wurden mit dem IL-6-Antikörper Tocilizumab und 17 (27,0 %) mit Anti-CD20-Antikörper Rituximab therapiert. Die Therapie wurde während der Studienzeit nicht verändert. Die Patientendaten wurden über 6 ± 2 Monate erhoben, dabei sind sieben Patienten (11,1 %) zu einer zweiten Bestimmung in sechs Monaten nicht erschienen.

3.2 CFU-ECs in der vorliegenden RA-Kohorte unter Einfluss von RA-Therapeutika

Die Endothelvorläuferzellen (*endothelial progenitor cells* – EPCs) wurden aus dem peripheren Blut der Patienten jeweils zu Beginn der Studie und 6 ± 2 Monate später bestimmt. Es wurde nicht nur der Einfluss der Medikamente auf EPCs ermittelt, sondern auch die möglichen Auswirkungen anderer, in Zusammenhang mit der RA stehenden Faktoren, berücksichtigt.

Da der Kolmogorov-Smirnov Test eine Normalverteilung bei allen Variablen zeigte, wurden daher die zu Anfang und ein halbes Jahr später erhobenen Werte mit einem T-Test für verbundene Stichproben verglichen. Dabei stellte sich ein signifikanter Anstieg der CFU-ECs innerhalb von sechs Monaten bei Patienten, welche mit Tocilizumab behandelt wurden, dar (am Anfang: $12 \pm 12,19$; nach sechs Monaten: $21,91 \pm 12,5$; $p = 0,031$). Im Gegensatz dazu, zeigten die Probanden mit anderen Medikamentengruppen im Verlauf keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der Endothelvorläuferzellen: Rituximab (am Anfang: $13,13 \pm 7,24$; nach sechs Monaten: $11,93 \pm 7,73$; $p = 0,637$), MTX (am Anfang: $22,33 \pm 14,01$; nach sechs Monaten: $21,47 \pm 26,43$; $p = 0,91$), anti-TNF α (am Anfang: $16,67 \pm 10,83$; nach sechs Monaten: $18,92 \pm 11,8$; $p = 0,37$).

Antirheumatika und CFU-ECs

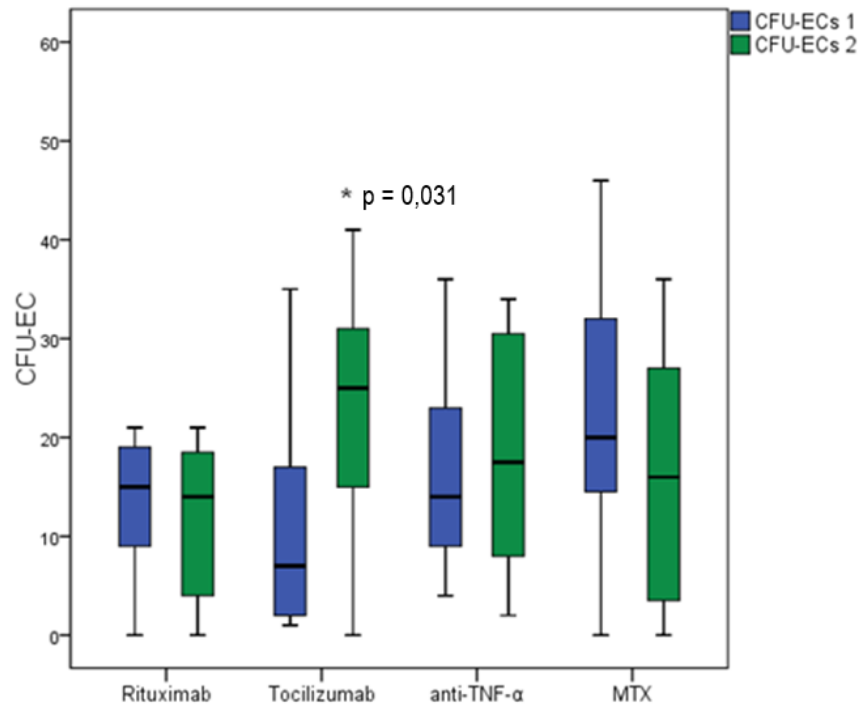


Abbildung 11: Vergleich von CFU-ECs zu Anfang der Studie (Zeitpunkt 1) und nach sechs Monaten (Zeitpunkt 2) in Bezug auf die Medikamentengruppen. Es wird ein signifikanter Anstieg ($p = 0,031$) der Anzahl der CFU-ECs in der Tocilizumab Gruppe verzeichnet.

Tabelle 8: Vergleich von CFU-ECs zu Anfang der Studie (CFU-ECs 1) und nach sechs Monaten (CFU-ECs 2) in Bezug auf die Medikamentengruppen. Es liegen Daten von insgesamt 55 Patienten vor.

	Medikation	N	Mittelwert	SD
CFU-ECs (Zeitp. 1)	Rituximab	15	13,13	7,239
	Tocilizumab	13	12	12,193
	anti-TNF- α	12	16,67	10,832
	MTX	15	22,33	14,014
	Gesamt	55	16,15	11,781
CFU-ECs (Zeitp. 2)	Rituximab	15	11,93	7,732
	Tocilizumab	13	21,77	12,504
	anti-TNF- α	12	18,92	11,797
	MTX	15	21,47	26,425
	Gesamt	55	18,38	16,633

Mithilfe von ANOVA mit Messwiederholung konnten mehrere statistische Daten zeitgleich untersucht werden. Somit konnte der Einfluss der Medikamente und der Zeit zugleich analysiert werden. Beim paarweisen Vergleich ergab sich auf 5 %-Niveau eine signifikante Differenz ($p = 0,022$) zwischen MTX und Rituximab im Outcome bezüglich CFU-ECs. Patienten, die mit MTX behandelt

wurden, wiesen zu Beginn und auch nach sechs Monaten eine viel höhere Anzahl von EPCs auf als Patienten mit Rituximab.

3.2.1 CFU-ECs in der RA-Kohorte und in der gesunden Kontrollgruppe

Beim Analysieren der CFU-ECs-Anzahl von Patienten mit RA nach erfolgter Therapie mit einem der vier Medikamentengruppen (CFU-ECs $18,38 \pm 16,63$) und einer gesunden Kohorte von 31 Probanden (CFU-ECs $26,84 \pm 13,38$) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,018$). Dabei war die Kolonieanzahl bei der gesunden Kontrollgruppe deutlich höher. Dies bestätigt nochmals den Befall der Gefäße unter RA und womöglich ein geringeres Potenzial zur Regeneration.

CFU-ECs bei RA-Patienten und Gesunden

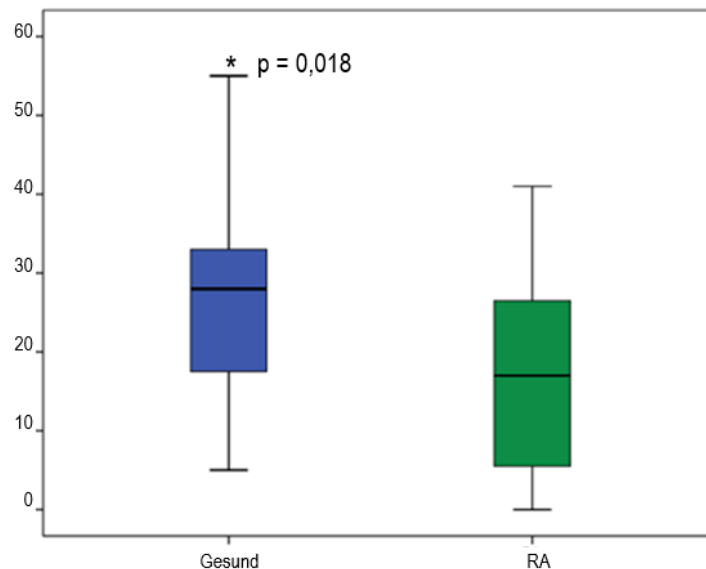


Abbildung 12: Ausbildung von CFU-ECs bei den RA-Patienten ($n = 55$) im Vergleich zu einer gesunden Kohorte ($n = 31$). Signifikant höhere Anzahl an den koloniebildenden Zellen bei der gesunden Kohorte ($p = 0,018$).

3.2.2 CFU-ECs unter Einfluss von Glukokortikoiden

42 von 55 Patienten (76,4 %) haben zusätzlich zu ihrer Therapie Glukokortikoide (GK) erhalten. Beim Vergleich der beiden Patientengruppen mit und ohne GK-Behandlung wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der EPCs zum zweiten Zeitpunkt (nach sechs Monaten) nachgewiesen ($p = 0,22$).

3.2.3 CFU-ECs und therapiebegleitende Medikation

Es ist bekannt, dass bestimmte Faktoren, die zu einer Minimierung des kardiovaskulären Risikos führen wie z. B. Statine oder sportliche Aktivität, zu einem Anstieg der EPCs führen und somit die Endothelregenerierung fördern. Statine steigern nicht nur die Anzahl, sondern auch die Funktion

der EPCs in vitro sowie im Mausmodell und bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK) (Walter et al. 2002; Vasa et al. 2001a). Noch vor Beginn dieser Studie wurden sieben Patienten (12,7 %) mit Statinen behandelt, ihre Medikation wurde während der Studienzeit nicht umgestellt (ein Patient aus der MTX + anti-TNF α -Gruppen, drei Patienten mit Tocilizumab- und zwei mit Rituximab-Therapie). Es konnte jedoch nach einem halben Jahr kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der EPCs bei Patienten, die Statine eingenommen haben und Patienten ohne Statinbehandlung ($p = 0,19$) nachgewiesen werden. Somit wurden diese Patienten aus der Studie nicht ausgeschlossen.

Bei 30 Patienten (54,5 %) war der Blutdruck mit Antihypertensiva eingestellt, 18 (32,7 %) davon hatten eine Monotherapie mit β -Blocker, ACE-Hemmer oder Diuretikum. Bei 25 Patienten (45,5 %) war keine arterielle Hypertonie diagnostiziert worden, somit haben sie auch keine Medikation erhalten. Die Wirkung der antihypertensiven Therapie auf CFU-ECs wurde ein halbes Jahr nach Beginn der Studie, ähnlich wie die der Statine und Prednisolon, bestimmt. Dabei wiesen Patienten mit Antihypertensiva einen signifikant niedrigeren CFU-ECs-Wert als Patienten ohne Antihypertensiva ($p = 0,017$) auf.

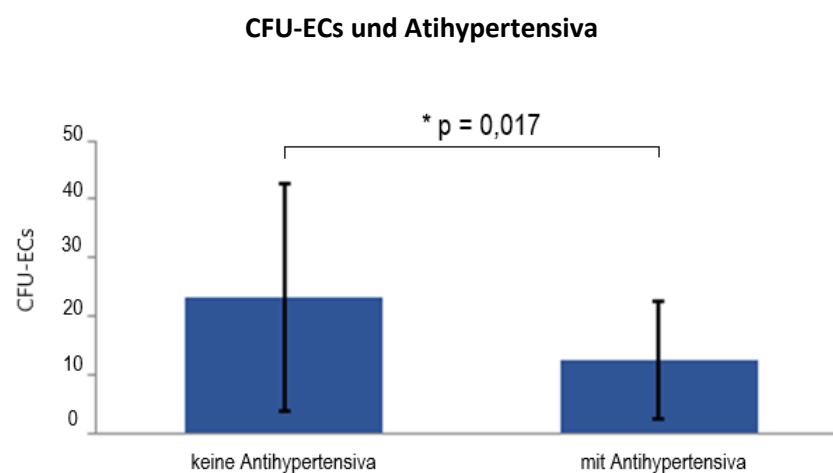


Abbildung 13: Vergleich der Anzahl der CFU-ECs bei Patienten jeweils mit und ohne zusätzliche antihypertensive Behandlung über einen Zeitraum von sechs Monaten. Patienten mit Antihypertensiva haben signifikant niedrigere CFU-ECs-Werte als ohne ($12,6 \pm 10,00$ vs. $23,20 \pm 19,48$; $p = 0,017$).

29 von 55 Patienten (52,7 %) haben als Ergänzung zu ihrer rheumatoiden Therapie Nichtsteroidale-Antirheumatika (NSAR) bekommen. Es ist bekannt, dass NSAR zu einem systolischen Blutdruckanstieg führen können, weswegen die antihypertensive Therapie intensiver eingestellt werden sollte (Montecucco und Mach 2009). Da es signifikante Werte bei den blutdrucksenkenden Medi-

kamenten gab, wurden die Patienten mit NSAR genauer untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen RA-Patienten mit und ohne NSAR in der Anzahl der CFU-EPCs ($15,54 \pm 10,69$ vs. $20,93 \pm 20,43$; $p = 0,233$).

3.2.4 CFU-ECs und Krankheitsaktivität

Anhand der Einteilung des Krankheitsverlaufs nach DAS28 in fehlende/geringe, mäßige und hohe Aktivität wurde das Verhalten der CFU-ECs in Bezug auf diese untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in CFU-ECs zum Zeitpunkt zwei, nach der erfolgten Therapie, zwischen den jeweiligen Stadien der Krankheit ($p = 0,385$).

Da der humorale Entzündungsparameter CRP bekanntlich mit der RA-Krankheitsaktivität korreliert, wurde hier ein möglicher Zusammenhang mit CFU-ECs analysiert. Jedoch erwiesen sich schon, ähnlich wie bei der Untersuchung des DAS28 keine signifikanten Korrelationen zwischen CRP und CFU-ECs am Anfang und CRP mit CFU-ECs am Ende der Therapie.

3.2.5 CFU-ECs und Anti-CCP sowie seropositive RA

26 von 55 Patienten (47,3 %) waren positiv für cyclische citrullinierte Peptid Antikörper (anti-CCP-Ak). Bei diesen Patienten wurde eine signifikant niedrigere Anzahl von CFU-ECs nach der Therapie mit einem der antirheumatischen Medikamente festgestellt ($13,35 \pm 10,08$ vs. $22,90 \pm 19,95$; $p = 0,032$).

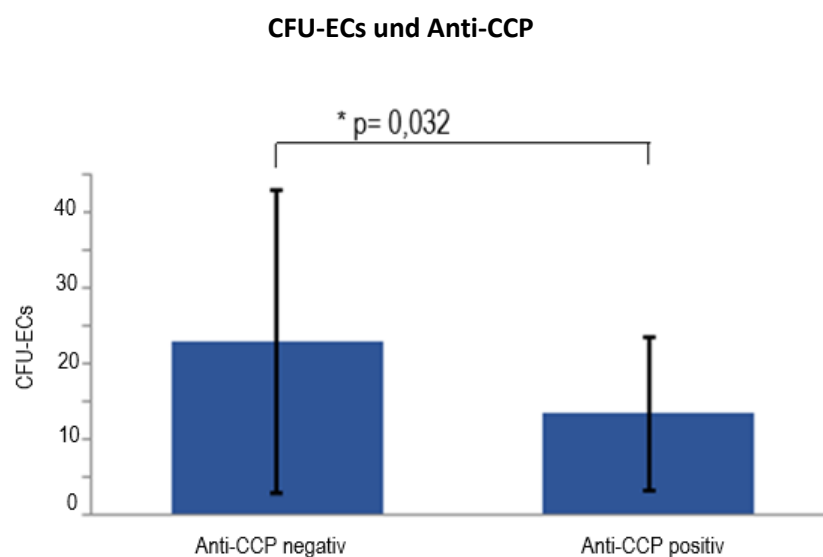


Abbildung 14: Nach sechsmonatiger Behandlung mit antirheumatischen Medikamenten kam es zu einem Abfall der Endothelvorläuferzellen bei den Patienten mit positivem anti-CCP-Ak im Vergleich zu den Patienten ohne anti-CCP-Ak ($13,35 \pm 10,08$ vs. $22,90 \pm 19,95$; $p = 0,032$).

Patienten mit seropositiver RA haben eine schlechtere Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufs und der Lebenserwartung. Interessanterweise ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der CFU-ECs bei den 22 Patienten, die Rheumafaktor-positiv waren ($19,73 \pm 19,71$ vs. $16,36 \pm 10,59$; $p = 0,468$).

3.2.6 CFU-ECs und Framingham Score Risiko (FS)

Wie bereits beschrieben, findet sich bei den Patienten mit kardio- sowie zerebrovaskulären Erkrankungen oftmals eine verminderte Anzahl von zirkulierenden Endothelvorläuferzellen im Blut. Ein ähnlicher Sachverhalt war auch hier vorzufinden in Bezug auf das *Framingham Score*. Patienten mit einem hohen Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren wiesen signifikant niedrigere Werte bezüglich ihrer CFU-ECs auf, auch nach der antirheumatischen Therapie, als Patienten mit einem niedrigen *Framingham-Score-Risiko* ($p = 0,029$) (siehe Abbildung 15/ Tabelle 9).

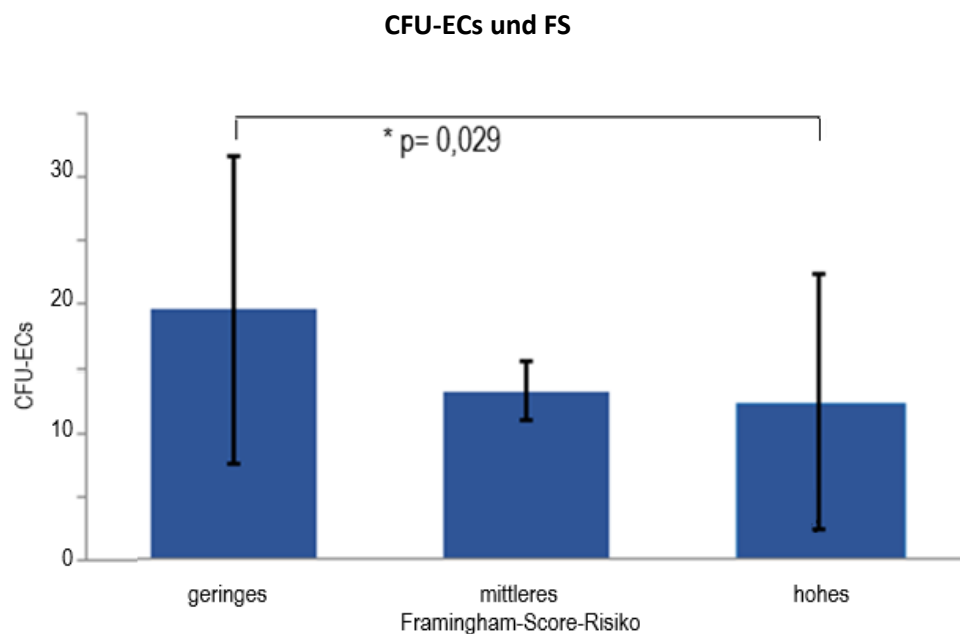


Abbildung 15: Koloniebildende Zellen in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko anhand des Framingham Score nach sechsmonatiger Therapie. Patienten mit einem hohen Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis haben eine signifikant niedrigere Anzahl der Endothelvorläuferzellen als Patienten mit einem niedrigen Framingham-Score-Risiko ($12,30 \pm 10,03$ vs. $19,59 \pm 12,18$; $p = 0,029$).

Tabelle 9: Endothelvorläuferzellen in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko anhand des Framingham Score nach sechs Monaten Therapie. Signifikante Unterschiede in der Anzahl zwischen dem niedrigen und dem hohen Risiko.

FS- Risiko	N	MW	SD	Signifikanz (p)	Min	Max
CFU-ECs niedriges Risiko (1)	29	19,59	12,18	(1-2) 0,349	0	41
mittleres Risiko (2)	3	13,20	2,31	(2-3) 0,897	11	15
hohes Risiko (3)	20	12,30	10,03	(1-3) 0,029	0	31
Gesamt	52	18,25	16,89		0	41

3.3 Stimulations- und Wachstumsfaktoren

Laut verschiedener Forschungsarbeiten unterliegen die Regeneration und die Proliferation von EPCs einem komplexen Zusammenspiel von Signalmolekülen. Sie sind unter anderem abhängig von Angiopoetin-1 (Ang-1) und 2 (Ang-2), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1). Bei 40 Patienten, jeweils zehn aus den entsprechenden Medikamentengruppen (MTX, anti-TNF α , Rituximab und Tocilizumab), wurden diese Wachstumsfaktoren der Angiogenese und Vaskulogenese zu Beginn der Studie und 6 ± 2 Monate später mithilfe von ELISA bestimmt.

Dabei wurden die Gefäßfaktoren auf eine mögliche Beeinflussung durch Medikamente, einen Zusammenhang mit den EPCs bzw. CFU und der Krankheitsaktivität untersucht.

3.3.1 Einfluss der RA-Therapeutika auf die Stimulations- und Wachstumsfaktoren

Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte eine NV (Normalverteilung) bei allen Variablen außer SDF-1 bei Tocilizumab und Rituximab, daher wurden die Vorher-/ Nachherwerte mit einem t-Test für verbundene Stichproben verglichen und nur SDF1 unter der Therapie mit den neuen Biologicals mit Wilcoxon.

Auffallend war der signifikante Abfall von SDF-1 im Verlauf der Studie bei Patienten in drei Medikamentengruppen. Unter der Rituximab-Therapie kam es zu einem Abfall von $334,5 \pm 591,73$ auf $248,4 \pm 487,24$ pg/ml ($p = 0,038$), unter der Tocilizumab-Behandlung von $109,6 \pm 216,35$ auf $78,1 \pm 175,55$ pg/ml ($p = 0,011$) und in der MTX-Gruppe von $48,10 \pm 21,09$ auf $22,50 \pm 23,16$ pg/ml ($p = 0,010$) (siehe Abbildung 16). Bei anti-TNF α konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich SDF-1 festgestellt werden, es zeigte sich aber unter der Therapie ein signifikanter Anstieg von Ang-1 von 45.202 ± 11.441 auf 63.778 ± 16.918 pg/ml ($p = 0,003$) (siehe Abbildung 17).

Antirheumatika und SDF-1

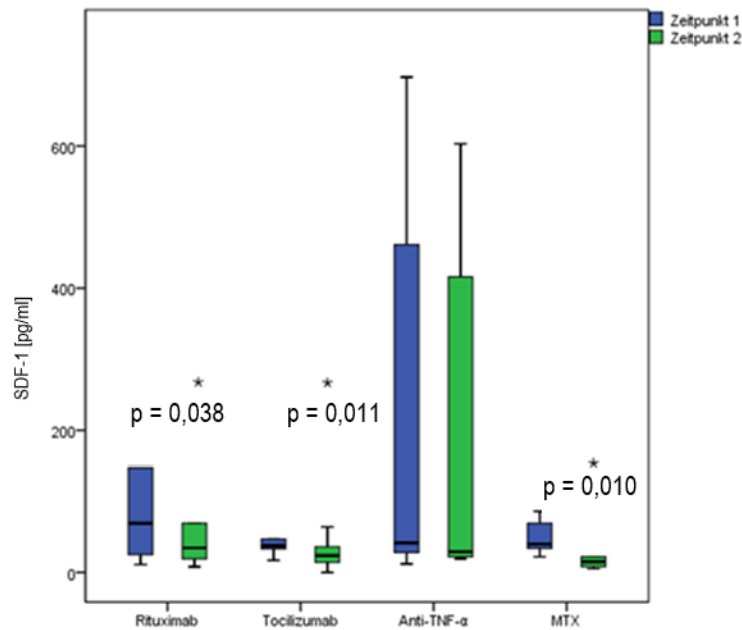


Abbildung 16: Verhalten von SDF-1 [pg/ml] unter antirheumatischer Therapie zu Beginn der Studie und nach sechs Monaten. Signifikanter Abfall unter Rituximab von $334,50 \pm 591,73$ auf $248,40 \pm 487,24$ pg/ml ($p = 0,038$), Tocilizumab von $109,60 \pm 216,35$ auf $78,10 \pm 175,55$ pg/ml ($p = 0,011$) oder MTX von $48,10 \pm 21,09$ auf $22,50 \pm 23,16$ pg/ml ($p = 0,010$).

Antirheumatika und Angiopoetin-1

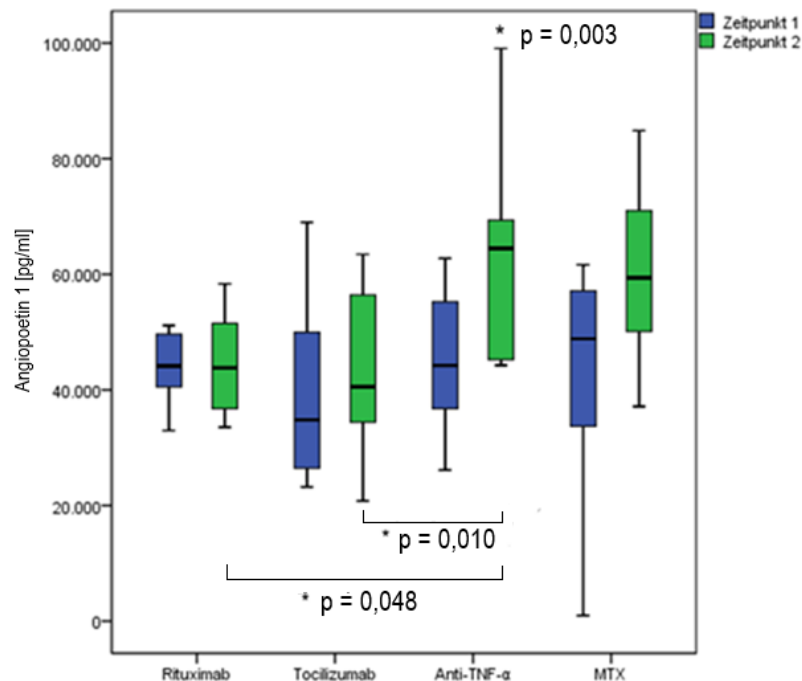


Abbildung 17: Verhalten von Ang-1 [pg/ml] unter antirheumatischer Therapie zu Beginn der Studie und nach sechs Monaten. Signifikanter Anstieg unter anti-TNFα von $45202,7 \pm 11440,6$ auf $63778,0 \pm 16918,5$ pg/ml ($p = 0,003$). Insgesamt ergaben sich signifikant höhere Spiegel unter der anti-TNFα als unter der Tocilizumab- ($p = 0,011$) bzw. Rituximab-Therapie ($p = 0,048$).

Betrachtete man das Verhalten von Angiotensin-1 genauer, so waren die Werte bei Patienten, die anti-TNF α erhalten haben, im Verlauf signifikant höher als bei Patienten mit Rituximab- ($p = 0,048$) oder Tocilizumab-Therapie ($p = 0,010$) (siehe Abbildung 17).

Angiotensin-2 und VEGF zeigten in keiner der vier Medikamentengruppen signifikante Veränderungen im Verlauf von sechs Monaten.

3.3.2 Einfluss von Prednisolon und Antihypertensiva auf Gefäßwachstumsfaktoren

Für die Ermittlung dieser Werte wurde das Serum der Patienten sechs Monate nach Beginn der Studie ausgewählt, um einen gewissen Wirkungseintritt zu erzielen, falls die Patienten zu Beginn der Studie neu medikamentös eingestellt wurden. Bei den 31 Probanden, die zusätzlich mit Prednisolon behandelt wurden, war SDF-1 signifikant höher ($167,7 \pm 320,34$ pg/ml; $p = 0,02$) als bei den neun, die keine Glukokortikoidtherapie ($27,78 \pm 21,23$ pg/ml) erhielten.

Bei Ang-1, Ang-2, VEGF ließ sich kein Unterschied bei Patienten mit und ohne Glukokortikoide feststellen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verhalten von Wachstumsfaktoren mit (1) und ohne (0) zusätzliche Therapie mit Prednisolon. Allein SDF-1 zeigt einen signifikanten Unterschied im Serumspiegel unter der Prednisolon-Behandlung. Patienten mit Glukokortikoidtherapie hatten höhere Werte als Patienten ohne ($167,7 \pm 320,34$ pg/ml vs. $27,78 \pm 21,23$ pg/ml; $p = 0,02$).

	Prednisolon	N	Mittelwert	SD	p (T-Test)
Ang-1 [pg/ml]	0	9	60080,44	15198,734	0,16
	1	31	51145,26	16557,639	
Ang-2 [pg/ml]	0	9	2440,67	768,997	0,20
	1	31	3051,65	1338,811	
VEGF [pg/ml]	0	9	308,11	222,717	0,40
	1	31	398,39	295,041	
SDF-1 [pg/ml]	0	9	27,78	21,230	0,02
	1	31	167,74	320,341	

Bei den blutdrucksenkenden Medikamenten wurde ähnlich vorgegangen. Hierbei war Angiotensin-2 signifikant höher bei den 19 Patienten, die mit Antihypertensiva (3334 ± 1371 pg/ml, $p = 0,04$) behandelt wurden, im Gegensatz zu den elf Probanden ohne diese Medikation (2534 ± 1021 pg/ml). Andere Gefäßwachstumsfaktoren zeigten keine Signifikanz bezüglich der antihypertensiven Therapie (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Verhalten von Wachstumsfaktoren mit (1) und ohne (0) zusätzliche antihypertensive Therapie. Patienten, die unter arterieller Hypertonie litten und behandelt wurden, hatten signifikant höhere Angiotensin-2 Serumspiegel als Patienten ohne antihypertensive Therapie ($3334,26 \pm 1371,81$ pg/ml vs. $2534,10 \pm 1020,96$ pg/ml; $p = 0,04$).

Antihypertensiv	N	Mittelwert	SD	p (T-Test)
Ang-1 [pg/ml] 0	21	51420,67	18983,082	0,49
1	19	55073,32	13518,112	
Ang-2 [pg/ml] 0	21	2534,1	1020,957	0,04
1	19	3334,26	1371,806	
VEGF [pg/ml] 0	21	312,19	185,537	0,12
1	19	450,89	348,389	
SDF-1 [pg/ml] 0	21	97,62	181,078	0,38
1	19	178,95	372,458	

3.3.3 Zusammenhang zwischen EPCs und Gefäßwachstumsfaktoren unter der antirheumatischen Therapie

Es ist bekannt, dass bei der RA eine verstärkte Angiogenese stattfindet. In der entzündeten Synovialmembran kommt es zu einer intensivierten Vaskularisation, was seinerseits zu einer Synovialverdickung (Pannusbildung) führt. Die pathologische Gefäßneubildung ist charakterisiert durch einen Anstieg der proangiogenetischen Faktoren sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit.

Beim Erwachsenen kann eine Gefäßneubildung auf zwei Wegen entstehen: durch Angiogenese, Sprossung neuer Gefäße aus bereits bestehenden oder durch Vaskulogenese, durch Rekrutierung der Endothelvorläuferzellen und Neubildung von Gefäßen.

Somit sollte eine mögliche Korrelation zwischen den EPCs und den proangiogenetischen Faktoren unter der Therapie festgestellt werden. Weder bei VEGF, SDF-1 noch Ang-1 konnte eine Korrelation ermittelt werden. Interessanterweise korrelierte CFU-ECs negativ mit Angiotensin-2 ($r = -0,592$; $p < 0,001$) nach sechs Monaten Therapie (siehe Abbildung 18/ Tabelle 12).

CFU-ECs und Angiopoetin-2

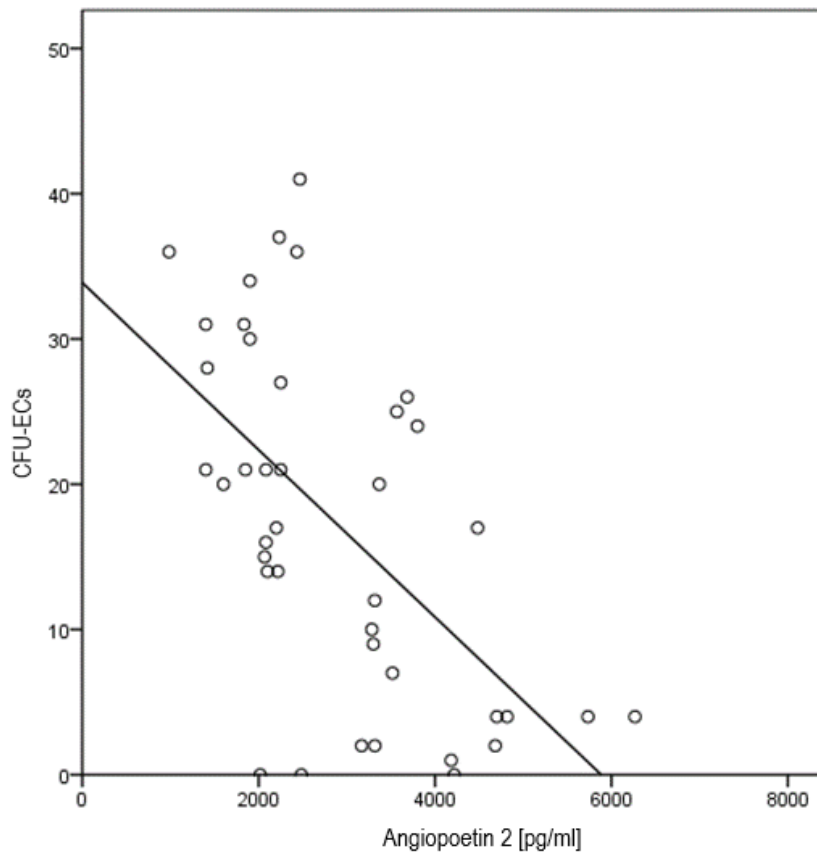


Abbildung 18: Negative Korrelation zwischen CFU-ECs und Ang-2 nach sechs Monaten Therapie ($r = -0,592$; $p < 0,001$).

Tabelle 12: Korrelation zwischen den CFU-ECs und den Gefäßwachstumsfaktoren. Allein bei Ang-2 ist eine negative Korrelation zu den Endothelvorläuferzellen nach sechsmonatiger Studienzeit festgestellt worden.

		CFU-ECs	Ang-1 [pg/ml]	Ang-2 [pg/ml]	VEGF [pg/ml]	SDF-1 [pg/ml]
CFU-ECs	Korrelation	1	0,074	-,592**	-0,114	0,105
	Signifikanz (2-seitig)		0,652	0	0,482	0,517
	N	55	40	40	40	40
Ang-1 [pg/ml]	Korrelation	0,074	1	-0,23	0,168	-0,037
	Signifikanz (2-seitig)	0,652		0,153	0,3	0,819
	N	40	40	40	40	40
Ang-2 [pg/ml]	Korrelation	-0,592	-0,23	1	0,263	-0,007
	Signifikanz (2-seitig)	0	0,153		0,101	0,966
	N	40	40	40	40	40
VEGF [pg/ml]	Korrelation	-0,114	0,168	0,263	1	-0,082
	Signifikanz (2-seitig)	0,482	0,3	0,101		0,613
	N	40	40	40	40	40
SDF 1 [pg/ml]	Korrelation	0,105	-0,037	-0,007	-0,082	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,517	0,819	0,966	0,613	
	N	40	40	40	40	40

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (zweiseitig).

3.3.4 Seropositive RA, CCP-AK und Gefäßwachstumsfaktoren

Da bei seropositiven RA-Patienten der Krankheitsverlauf meist schwerer ist, kann es auch zu einer verstärkten Angio-/ Vaskulogenese kommen. Es zeigte sich jedoch keine Signifikanz bei Ang-1, Ang-2, SDF-1, VEGF bezüglich des Rheumafaktors (19 Patienten RF positiv, 20 negativ). Ähnliche Ergebnisse erzielten wir auch beim Betrachten der Gefäßwachstumsfaktoren und des CCP-AK (20 Patienten positiv getestet, 20 negativ für CCP-AK) unter der Therapie.

3.3.5 Gefäßwachstumsfaktoren bei RA-Patienten und gesunder Kontrollgruppe

Insgesamt waren 16 gesunde Freiwillige ohne autoimmune, kardiovaskuläre oder sonstige chronische Erkrankungen, eine vergleichbare Kontrollgruppe zu den RA-Patienten, an der Studie beteiligt. Ein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe ließ sich bei Ang-1 ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$) und SDF-1 ($p < 0,001$) feststellen. Bei Ang-2 (2.914 ± 1.251 pg/ml) waren die Werte bei den RA-Patienten nicht signifikant höher als bei der gesunden Kohorte (2.242 ± 1.605 pg/ml). Bei Ang-1 (51.155 ± 16.509 pg/ml) und VEGF ($378,08 \pm 280,35$ pg/ml) waren die Werte der RA-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Ang-1 5.606 ± 1.834 pg/ml; VEGF $17,19 \pm 12,89$ pg/ml) um vielfaches erhöht, wohingegen SDF-1 bei den Erkrankten ($136,25 \pm 287,29$ pg/ml) niedrigere Serumkonzentrationen als bei den Gesunden ($21443,25 \pm 468,93$ pg/ml) aufwies (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich der Serumkonzentration an Gefäßwachstumsfaktoren zwischen gesunder Kontrollgruppe und erkrankter Kohorte. Ein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe ließ sich bei Ang-1 ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$) und SDF-1 ($p < 0,001$) feststellen.

		N	Mittelwert	SD	p-Wert
Ang-1 [pg/ml]	Patienten	40	53155,68	16509,16	<0,001
	Kontrolle	16	5606,25	1834,52	
Ang-2 [pg/ml]	Patienten	40	2914,18	1251,74	0,101
	Kontrolle	16	2242,56	1605,5	
VEGF [pg/ml]	Patienten	40	378,08	280,35	<0,001
	Kontrolle	16	17,19	12,89	
SDF-1 [pg/ml]	Patienten	40	136,25	287,29	<0,001
	Kontrolle	16	2143,25	468,93	

3.3.6 Der Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Gefäßstimulationsfaktoren nach erfolgter Therapie

Von den 40 Patienten, bei denen mithilfe von ELISA Ang-1, Ang-2, VEGF und SDF-1-Spiegel im Serum ermittelt wurden, wurde bei 38 Probanden der DAS28 nach einem halben Jahr Therapiedauer bestimmt. Nach der Einteilung der Erkrankten in drei Gruppen mit fehlender bis geringer, mittlerer

und hoher Krankheitsaktivität kam die Fragestellung auf, ob das Krankheitsstadium einen möglichen Einfluss auf die Gefäßstimulationsfaktoren hat. Weder bei Ang-1, Ang-2 noch SDF-1 konnten signifikante Veränderungen gefunden werden. Jedoch zeigte VEGF einen signifikanten Unterschied zwischen der fehlenden und hohen Krankheitsaktivität ($p = 0,032$) sowie zwischen mittleren und hohen ($p = 0,022$). In beiden Fällen waren die VEGF-Serumspiegel deutlich niedriger als bei der hohen Krankheitsaktivität (siehe Tabelle Nr. 14). Dies entspricht auch dem momentanen Forschungsstand und bestätigt die Annahme, dass VEGF eine proinflammatorische Rolle in der Pathogenese der RA spielt (Yoo et al. 2008). Laut der Studie von Lee et al. korreliert es, ähnlich wie in diesem Forschungsprojekt, positiv mit der Krankheitsaktivität (Lee et al. 2001).

Tabelle 14: Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Wachstumsfaktoren im direkten Vergleich der Aktivitätsstärke untereinander.

Krankheitsaktivität	N	Mittelwert	SD	P	Min	Max
Ang-1 [pg/ml] fehlende bis geringe (1)	13	59177,23	12481,467	(1-2) 0,093	37143	77807
Mittlere (2)	19	49405,42	18881,494	(2-3) 0,861	20790	99073
Hohe (3)	6	48106,67	8672,639	(1-3) 0,163	35823	58337
Gesamt	38	52543,34	16057,339		20790	99073
Ang-2 [pg/ml] fehlende bis geringe (1)	13	2688,46	1264,601	(1-2) 0,614	983	4817
Mittlere (2)	19	2919,32	1209,504	(2-3) 0,214	1400	6267
Hohe (3)	6	3666,67	1422,355	(1-3) 0,125	2017	5733
Gesamt	38	2958,34	1269,437		983	6267
VEGF [pg/ml] fehlende bis geringe (1)	13	331,08	181,862	(1-2) 0,956	60	720
Mittlere (2)	19	325,68	225,48	(2-3) 0,022	47	716
Hohe (3)	6	630,17	503,455	(1-3) 0,032	122	1334
Gesamt	38	375,61	286,7		47	1334
SDF 1 [pg/ml] fehlende bis geringe (1)	13	103,77	186,028	(1-2) 0,806	5	603
Mittlere (2)	19	130,21	222,914	(2-3) 0,345	0	747
Hohe (3)	6	263,33	595,369	(1-3) 0,283	3	1478
Gesamt	38	142,18	293,718		0	1478

3.4 Auswirkung der antirheumatischen Medikation auf Serum-Lipid-Konzentration

Da die Serum-Lipid-Konzentrationen eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Ereignissen spielen, wurden Gesamtcholesterol, *high-density-lipoprotein* (HDL), *low-density-lipoprotein* (LDL) und Triglyceride-Serumspiegel am Anfang der Studie und sechs Monate später bestimmt. Es gab keine signifikanten Veränderungen im Gesamtcholesterol-Serumspiegel weder im Laufe der sechs Monate bei den jeweiligen Medikamentengruppen noch im Vergleich der Medikamentengruppen untereinander.

Es kam jedoch zu einem signifikanten Anstieg der LDL-Serumspiegel innerhalb von sechs Monaten bei Tocilizumab von $132,62 \pm 35,69$ mg/dl auf $158,15 \pm 41,44$ mg/dl ($p = 0,012$) und bei anti-TNF α von $125,92 \pm 27,99$ mg/dl auf $142,25 \pm 34,83$ mg/dl ($p = 0,020$) (siehe Abbildung 19).

Antirheumatika und LDL-Spiegel

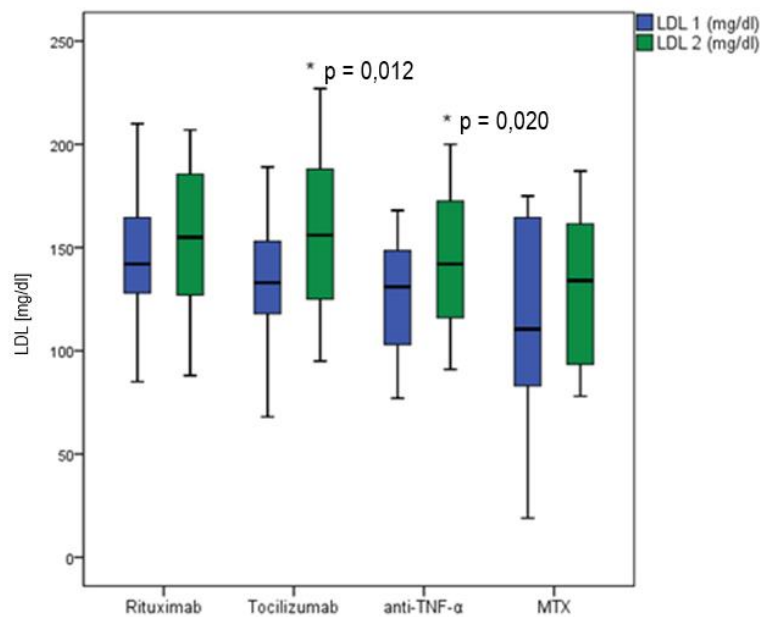


Abbildung 19: Veränderung der LDL-Spiegel im Laufe der Studie in Bezug auf die jeweilige RA-Therapie. Signifikanter Serumanstieg in der Tocilizumabgruppe von $132,62 \pm 35,69$ mg/dl auf $158,15 \pm 41,44$ mg/dl ($p = 0,012$) und in der anti-TNF α -Gruppe von $125,92 \pm 27,99$ mg/dl auf $142,25 \pm 34,83$ mg/dl ($p = 0,020$).

Außerdem ergab sich beim paarweisen Vergleich auf 5 %-Niveau eine signifikante Differenz ($p = 0,050$) zwischen der Rituximab-Gruppe und der MTX-Gruppe. Patienten, die mit MTX behandelt wurden, hatten zu Beginn und sechs Monate später niedrigere LDL Konzentrationen als Patienten, die Rituximab erhalten haben.

HDL-Spiegel zeigten keine signifikanten Veränderungen im Verlauf. Verglich man jedoch die Serumkonzentrationen der jeweiligen Medikamentengruppen untereinander, so stellte man in der Tocilizumab-Gruppe (zu Beginn $54,23 \pm 23,35$ mg/dl, sechs Monate später $57,85 \pm 20,12$ mg/dl) signifikant niedrigere Spiegel als bei den Rituximab-Patienten (zu Beginn $77,07 \pm 28,81$ mg/dl, sechs Monate danach $72,93 \pm 23,98$ mg/dl, $p = 0,036$) fest (siehe Abbildung 20).

Antirheumatika und HDL-Spiegel

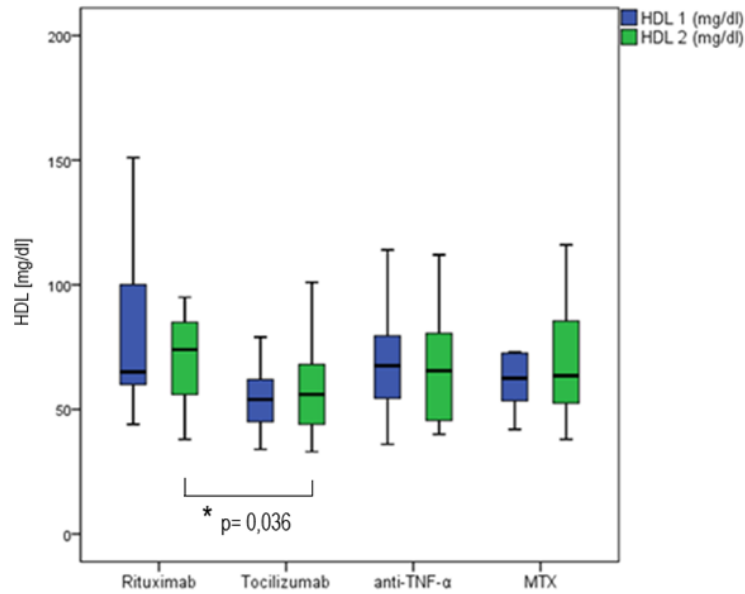


Abbildung 20: Veränderung der HDL-Spiegel im Laufe von sechs Monaten in Bezug auf die RA-Medikation; Tocilizumab zeigt signifikant niedrigere HDL-Spiegel als Rituximab ($p = 0,036$).

Beim paarweisen Vergleich wurde auch eine ähnliche Tendenz bei den Triglycerid-Serumspiegeln festgestellt. Hierbei waren jedoch die Konzentrationen in der Tocilizumab-Gruppe (zu Beginn $196,0 \pm 169,96$ mg/dl, nach sechs Monaten $188,62 \pm 91,79$ mg/dl) signifikant höher als in der MTX-Gruppe (zu Beginn $112,5 \pm 47,68$ mg/dl, nach sechs Monaten $116,08 \pm 54,99$ mg/dl; $p = 0,016$) und der anti-TNF α -Gruppe (zu Beginn $128,0 \pm 106,73$ mg/dl, nach sechs Monaten $115,83 \pm 78,18$ mg/dl; $p = 0,029$) (siehe Abbildung 21).

Antirheumatika und Triglycerid –Spiegel

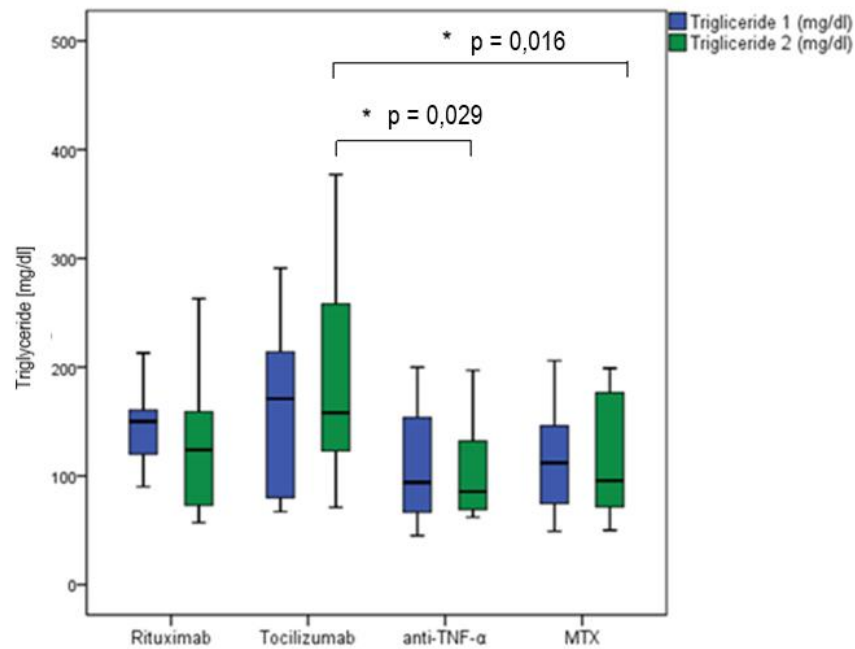


Abbildung 21: Veränderung der Triglycerid-Spiegel im Laufe von sechs Monaten in Bezug auf die RA-Medikation. Signifikante Unterschiede in den Serumkonzentrationen zwischen Tocilizumab und anti-TNF α ($p = 0,029$) und Tocilizumab und MTX ($p = 0,016$).

3.5 DAS28

3.5.1 DAS28 im Vergleich unter Tocilizumab, Rituximab, TNF α - Blocker, MTX

Betrachtet man die gesamte RA-Kohorte so findet sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,343$) zwischen dem DAS28 zu Beginn und am Ende der Studie. Vergleicht man aber den Verlauf des DAS28 für jedes antirheumatische Medikament einzeln mit einem t-Test für verbundene Stichproben, so ist nur bei Tocilizumab eine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität von $4,53 \pm 0,381$ auf $3,813 \pm 0,350$; $p = 0,020$ vorzufinden (siehe Abbildung 22/ Tabelle 15). Trotz dieser Veränderung ist die Krankheitsaktivität immer noch als mäßig einzuordnen.

Antirheumatika und DAS28

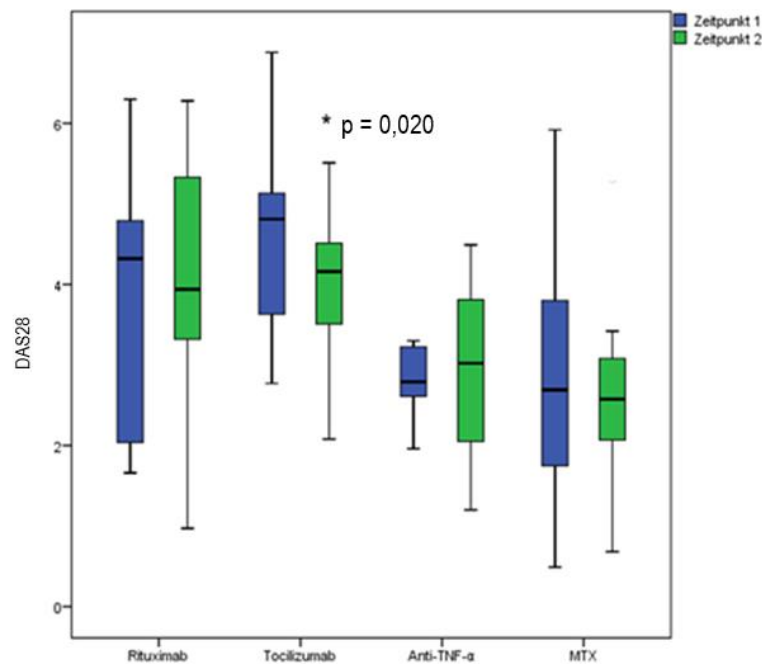


Abbildung 22: Verlauf von DAS28 innerhalb der Studienzeit zu Beginn (Zeitpunkt 1) und nach sechs Monaten (Zeitpunkt 2) für Tocilizumab, Rituximab, TNF α -Blocker und MTX. Abnehmende Krankheitsaktivität in der Tocilizumab Gruppe ($p = 0,020$). Mittlere bis hohe Krankheitsaktivität unter Rituximab und Tocilizumab, im Gegensatz zu den TNF α -Blockern und MTX mit am ehesten fehlenden bis geringen Aktivität.

Tabelle 15: Einfluss der antirheumatischen Medikation auf die Krankheitsaktivität im Verlauf der Studie zum Zeitpunkt 1 – Beginn der Studie, Zeitpunkt 2 – nach sechsmonatiger Behandlung. Allein bei Tocilizumab eine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität (von $4,53 \pm 0,381$ auf $3,813 \pm 0,350$; $p = 0,020$).

Medikation	DAS28	N	MW	SD	95%-Konfidenzintervall		P
					Untergrenze	Obergrenze	
Rituximab	Zeitpunkt 1	15	3,807	1,689	3,094	4,52	0,302
	Zeitpunkt 2		4,043	1,47	3,388	4,697	
Tocilizumab	Zeitpunkt 1	13	4,527	1,224	3,761	5,293	0,02
	Zeitpunkt 2		3,813	1,122	3,11	4,516	
TNF α -Blocker	Zeitpunkt 1	11	2,728	0,609	1,896	3,561	0,548
	Zeitpunkt 2		2,916	1,188	2,152	3,68	
MTX	Zeitpunkt 1	14	2,746	1,541	2,008	3,484	0,426
	Zeitpunkt 2		2,54	1,192	1,863	3,217	

Beim Vergleich der Medikamente untereinander fallen im Mittel erhöhte DAS28-Werte bei Rituximab und Tocilizumab auf. Hierbei findet man auch einen signifikanten Unterschied zwischen Rituximab ($3,93 \pm 0,32$) und TNF α -Blocker ($2,82 \pm 0,37$), $p = 0,029$ sowie zwischen Rituximab und MTX ($2,64 \pm 0,33$), $p = 0,007$. Ähnlich ist es auch bei Tocilizumab ($4,17 \pm 0,34$) bezüglich der TNF α -Blocker ($p = 0,010$) und MTX ($p = 0,002$). Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass sowohl Rituximab als

auch Tocilizumab nur beim vorherigen Versagen der anderen Therapeutika, gemessen zum Teil auch an höherer Krankheitsaktivität, eingesetzt werden (siehe Tabelle 16).

Es liegt auch nicht der Beginn einer Therapie am Startpunkt der sechs Monate, sondern es wurden zum Teil schon laufende Therapien erfasst.

Tabelle 16: Vergleich der antirheumatischen Therapeutika untereinander im Hinblick auf die Krankheitsaktivität. Signifikante Unterschiede zwischen Rituximab und TNF α -Blockern ($p = 0,029$), Rituximab und MTX ($p = 0,007$) sowie Tocilizumab und den TNF α -Blockern ($p = 0,010$) und MTX ($p = 0,002$).

(I)Medikation	(II)Medikation	Mittlere Differenz (I-II)	Standardfehler	p	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^a	
					Untergrenze	Obergrenze
Rituximab	Tocilizumab	-0,245	0,467	0,602	-1,184	0,694
	TNF α -Blocker	1,102*	0,489	0,029	0,119	2,086
	MTX	1,282*	0,458	0,007	0,361	2,203
Tocilizumab	Rituximab	0,245	0,467	0,602	-0,694	1,184
	TNF α -Blocker	1,348*	0,505	0,01	0,333	2,363
	MTX	1,527*	0,475	0,002	0,573	2,482
TNF α -Blocker	Rituximab	-1,102*	0,489	0,029	-2,086	-0,119
	Tocilizumab	-1,348*	0,505	0,01	-2,363	-0,333
	MTX	0,179	0,497	0,72	-0,819	1,178
MTX	Rituximab	-1,282*	0,458	0,007	-2,203	-0,361
	Tocilizumab	-1,527*	0,475	0,002	-2,482	-0,573
	TNF α -Blocker	-0,179	0,497	0,72	-1,178	0,819

3.5.2 PWV und Alx@75 im Hinblick auf DAS28

Hierbei wird der Einfluss der PWV, nach der erfolgten Therapie mit antirheumatischen Medikamenten, auf die Krankheitsaktivität überprüft. Es gibt signifikante Unterschiede zwischen geringer und hoher ($p = 0,002$) sowie zwischen mittlerer und hoher Krankheitsaktivität ($p = 0,017$). Mit steigenden PWV-Werten kommt es zu einer Progression des Krankheitsstadiums (siehe Abbildung 23).

Wohingegen der Augmentationsindex, nach der Einteilung nach den drei Stadien der Krankheitsaktivität, keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen gezeigt hat.

PWV und DAS28

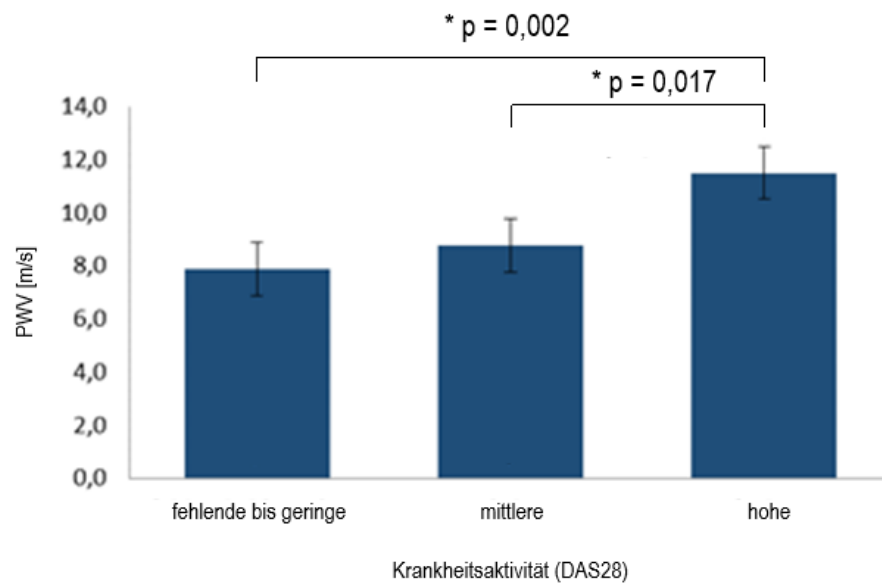


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen DAS28, eingeteilt in Stadien, und der Pulswellengeschwindigkeit nach sechs Monaten Therapie. Signifikant höhere PWV [m/s] bei der hohen Krankheitsaktivität im Gegensatz zu der geringen und mittleren Aktivität.

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität beurteilt mit DAS28 und PWV bzw. Augmentationsindex. Signifikant höhere PWV [m/s] bei der hohen Krankheitsaktivität im Gegensatz zu der geringen und mittleren Aktivität.

Krankheitsaktivität		N	MW	SD	P	Min.	Max.
AlxHR75[%]	fehlende bis geringe (1)	22	24,64	8,409	(1-2) 0,197	10	42
	mittlere (2)	24	28,42	11,594	(2-3) 0,781	5	46
	hohe (3)	6	29,67	4,885	(1-3) 0,270	23	37
	Gesamt	52	26,96	9,812		5	46
PWV[m/s]	fehlende bis geringe (1)	22	7,868	1,6040	(1-2) 0,206	5,4	11,8
	mittlere (2)	24	8,779	2,6948	(2-3) 0,017	4,9	16,2
	hohe (3)	6	11,50	3,5406	(1-3) 0,002	6,5	16,0
	Gesamt	52	8,708	2,6052		4,9	16,2

3.5.3 Krankheitsaktivität und RF bzw. Anti-CCP

Es wurde untersucht, ob es einen Bezug zwischen der Krankheitsaktivität, eingeteilt in drei Stadien (geringe/ mittlere/ hohe Krankheitsaktivität), der antirheumatischen Therapie und der Seropositivität gibt. Es gab weder eine Signifikanz zwischen den RF positiven und RF-negativen Patienten ($p = 0,486$), noch zwischen Anti-CCP positiven und -negativen ($p = 0,770$).

3.5.4 Krankheitsaktivität und die Begleitmedikation

Unter anderem wurde kein signifikanter Einfluss bzw. Unterschied auf die Einstufung in das jeweilige Krankheitsstadium bei den Patienten mit und ohne GK- ($p = 0,615$) oder NSAR-Therapie ($p = 0,088$) festgestellt.

Anders war es bei Patienten mit antihypertensiver Therapie im Vergleich zu denen ohne antihypertensive Behandlung. Diejenigen, die an Bluthochdruck litten, waren bezüglich ihres DAS28 eher in die mittlere und hohe Krankheitsaktivität einzuordnen ($p = 0,020$) (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Verteilung der Patienten mit und ohne arteriellen Hypertonus bzw. antihypertensive Therapie auf die Krankheitsaktivitäten: fehlende bis geringe, mittlere und hohe, nach DAS28. Hypertoniker waren nach DAS28 vor allem in der mittleren und hohen Krankheitsaktivität vorzufinden ($p = 0,020$).

		Krankheitsaktivität			Gesamt
		Fehlende/ geringe	Mittlere	Hohe	
Pat. ohne Antihypertensiva	Anzahl	14	14	0	28
	% innerhalb von Krankheitsaktivität	63,60%	56,00%	0,00%	52,80%
Pat. mit Antihypertensiva	Anzahl	8	11	6	25
	% innerhalb von Krankheitsaktivität	36,40%	44,00%	100,00%	47,20%
Gesamt	Anzahl	22	25	6	53
	% innerhalb von Krankheitsaktivität	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

3.6 Framingham Score

3.6.1 Framingham Score bei RA unter antirheumatischer Behandlung

Bei den Patienten wurde zu Beginn und sechs Monate später das Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis innerhalb der nächsten zehn Jahre zu erleiden anhand des *Framingham Scores* (FS) erhoben. Die Patienten wurden je nach erhaltenem Prozentwert in drei Gruppen eingeteilt: geringes, mittleres und hohes Risiko. Entsprechend den ACC/AHA-Leitlinien von 2013 zählten Patienten mit Diabetes mellitus, chronischer Nierenerkrankung, TIA, peripheren Arterienerkrankungen usw. zu der Gruppe mit einem hohen Risiko ($> 20\%$) für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren (Goff et al. 2014.) 2016 kam eine neue Empfehlung seitens von EULAR. Bei den RA-Patienten soll das kardiovaskuläre Risiko, berechnet mittels Framingham score, mit 1,5 multipliziert werden, aufgrund eines per se erhöhten Risikos für ein kardiovaskuläres Ereignis (Agca et al. 2017).

Zu Beginn der Studie mit 63 Patienten hatten 37 (58,7 %) Probanden ein geringes Risiko, neun (14,3 %) ein mittleres Risiko und 17 (27,0 %) Patienten ein hohes Risiko. Nach ca. sechs Monaten haben noch 55 Patienten an der Studie weiterhin teilgenommen und es wurde bei 53 der FS bestimmt. Hiervon hatten 29 (54,7 %) ein niedriges, drei (5,7 %) ein mittleres und 21 (39,6 %) ein

hohes Risiko. Da die Verteilung des Risikos unter den Medikamentengruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies, verzichtete man im Nachhinein auf die Aufteilung nach den Risikogruppen und verwendete hierfür den Mittelwert. Weder im Verlauf, betrachtet man FS insgesamt ($p = 0,138$), noch bei der getrennten Untersuchung der Medikamentengruppen innerhalb der Studienzeit hat es signifikante Änderungen gegeben (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Einfluss der antirheumatischen Therapie auf den Framingham Score innerhalb der Studienzeit von sechs Monaten, zu Beginn und nach mindestens sechsmonatiger Therapie mit dem jeweiligen Mittel. Keine signifikanten Veränderungen in den Gruppen.

Medikation	FS	N	Mittelwert	SD	Signifikanz (p)
Rituximab	Zeitpunkt 1	16	18,59	18,02	0,216
	Zeitpunkt 2		20,02	16,94	
Tocilizumab	Zeitpunkt 1	13	18,46	16,29	0,758
	Zeitpunkt 2		19,15	18,13	
TNF α -Blocker	Zeitpunkt 1	12	13,75	14,62	0,224
	Zeitpunkt 2		15,87	14,97	
MTX	Zeitpunkt 1	12	8,63	13,14	0,076
	Zeitpunkt 2		10	13,19	

Außerdem gab es keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der vier Medikamentengruppen untereinander (siehe Abbildung 24).

Antirheumatika und Framingham Score

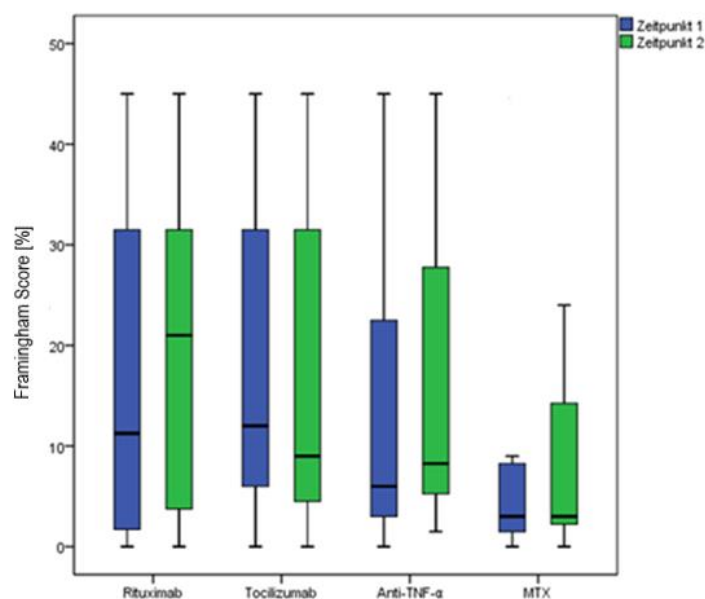


Abbildung 24: Keine signifikanten Änderungen des Framingham Scores innerhalb der Studienzeit für Tocilizumab, Rituximab, TNF α -Blocker und MTX, sowohl in den jeweiligen Gruppen als auch im Vergleich der Medikamentengruppen untereinander.

3.6.2 Framingham Score im Hinblick auf RF und Anti-CCP

Da die seropositive RA und das Vorhandensein von Anti-CCP eine schlechtere Prognose in Bezug auf den Krankheitsverlauf als auch auf mögliche Folgeerkrankungen wie z. B. Atherosklerose hat, wurde vermutet dass RF- und Anti-CCP-positive Patienten ein höheres kardiovaskuläres Risiko haben. Dabei wurden die 53 Patienten in drei Gruppen nach Framingham Score und einzeln nach seropositiv für RF und Anti-CCP eingeteilt. Daten, die am Ende der Studie nach erfolgter Therapie, gewonnen wurden, wurden untersucht. Es zeigte sich jedoch weder bei dem einen noch bei dem anderen Autoantikörper ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (RF: $p = 0,306$; Anti-CCP: $p = 0,320$).

Tabelle 20: Verteilung anhand des Framingham Scores nach erfolgter Therapie bei seropositiven und -negativen Patienten und mit und ohne Nachweis von Anti-CCP.

			Framingham Score			Gesamt
			niedriges Risiko	mittleres Risiko	hohes Risiko	
Rheumafaktor	0	Anzahl	16	3	12	31
		%	55,20%	100,00%	57,10%	58,50%
	1	Anzahl	13	0	9	22
		%	44,80%	0%	42,90%	41,50%
Anti-CCP	0	Anzahl	17	2	8	27
		%	58,60%	66,70%	38,10%	50,90%
	1	Anzahl	12	1	13	26
		%	41,40%	33,30%	61,90%	49,10%

3.6.3 Einfluss therapiebegleitender Medikamente auf das Framingham score

Obwohl Glukokortikoide das kardiovaskuläre Risiko erhöhen und von den 53 Patienten 42 mit Prednisolon zusätzlich zur antirheumatischen Therapie behandelt wurden, hatten 23 (76,7 %) von ihnen ein niedriges Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren. Es wurde keine Signifikanz zwischen den Risikogruppen mit und ohne Einnahme von Prednisolon ($p = 0,850$) festgestellt.

Wohingegen es signifikante Unterschiede in Bezug auf Framingham Score und die Behandlung mit NSAR ($p = 0,031$) bzw. Antihypertensiva ($p = 0,013$) gab.

Patienten, die keine nichtsteroidalen Antirheumatika zusätzlich bekommen haben, hatten eher ein geringes Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren zu erleiden. Studienteilnehmer mit NSAR-Behandlung waren in die hohe Risikogruppe einzustufen (siehe Abbildung 25).

Framingham Score und NSAR

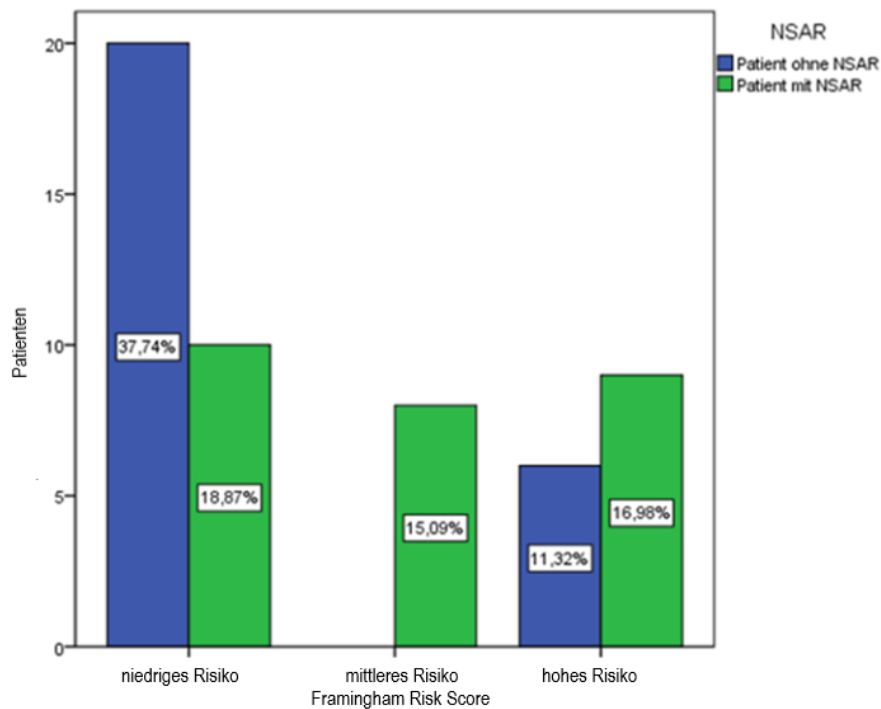
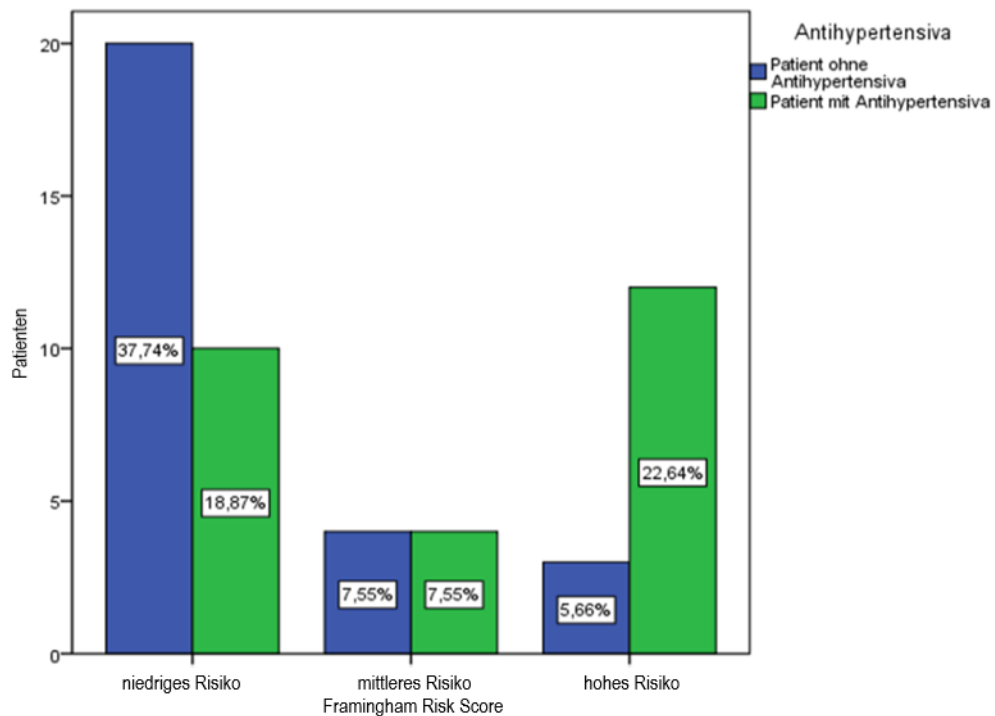


Abbildung 25: Einfluss der NSAR-Therapie auf den Framingham Score. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Behandlung mit NSAR zwischen den verschiedenen Risikogruppen berechnet mittels Framingham Score ($p = 0,031$). Patienten ohne NSAR haben eher ein niedriges Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse. Verteilung der Patienten mit und ohne NSAR-Therapie auf die jeweiligen Risikogruppen bezüglich des kardiovaskulären Risikos. Zur besseren Veranschaulichung mit zusätzlicher prozentualer Verteilung.

Eine ähnliche Verteilung gab es auch bei der antihypertensiven Therapie. Patienten ohne einen bekannten Hypertonus und somit ohne blutdrucksenkende Medikamente gehören zur Gruppe mit einem geringen Risiko. Ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, ähnlich wie in der Normalbevölkerung, besteht bei Hypertonikern, auch unter Therapie (siehe Abbildung 26).

Framingham Score und Antihypertensiva



c

Abbildung 26: Verteilung der Patienten mit und ohne antihypertensive Therapie auf die jeweiligen Risikogruppen in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko. Patienten ohne antihypertensive Therapie hatten eher ein geringes Risiko, wohingegen Erkrankte mit blutdrucksenkenden Medikamenten ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse aufwiesen. Zur besseren Veranschaulichung mit zusätzlicher prozentualer Verteilung.

Tabelle 21: Verteilung der Patienten anhand FS (geringes/mittleres/hohes kardiovaskuläres Risiko) und der jeweiligen Zusatztherapie mit Prednisolon, bzw. NSAR, bzw. Antihypertensiva nach mindestens sechsmonatiger Behandlung.

			Framingham Score			Gesamt
			niedriges Risiko	mittleres Risiko	hohes Risiko	
Prednisolon	0	Anzahl	6	1	4	11
		%	30,70%	33,30%	19,00%	20,80%
	1	Anzahl	23	2	17	42
		%	79,30%	66,70%	81,00%	79,20%
NSAR	0	Anzahl	19	1	6	26
		%	65,50%	33,30%	28,60%	49,1
	1	Anzahl	10	2	15	27
		%	34,50%	66,70%	71,40%	50,90%
Antihypertensiva	0	Anzahl	19	2	6	27
		%	65,50%	66,70%	28,60%	50,90%
	1	Anzahl	10	1	15	26
		%	34,50%	33,30%	71,40%	49,10%

3.7 Pulswellengeschwindigkeitsanalyse und Augmentationsindex

Für die Auswirkungen der antirheumatischen Therapie und anderer Faktoren der RA auf das kardiovaskuläre System wurde nicht nur der Einfluss auf das mikrovaskuläre System mithilfe von CFU-EPCs und Gefäßwachstumsfaktoren untersucht, sondern auch mögliche Veränderungen im makrovaskulären Bereich genauer analysiert. Hierfür wurde die Pulswellengeschwindigkeit (*pulse wave velocity*, PWV) und der Augmentationsindex (Alx) bei Patienten zu Beginn und am Ende der Studienzeit (nach 6 ± 2 Monate) bestimmt.

Sowohl die Pulswellengeschwindigkeit als auch der Augmentationsindex sind unter anderem stark vom Alter abhängig. Um einen Vergleich zwischen den Gruppen ermöglichen zu können, musste erstmals untersucht werden, ob die Altersverteilung der Patienten in den vier Hauptmedikamentengruppen ähnlich ist. Anhand der Tabelle 22 kann man die Altersverteilung nachverfolgen, es war keine Signifikanz zwischen den Gruppen ($p = 0,570$) festzustellen.

Tabelle 22: Altersverteilung in den jeweiligen vier Medikamenten-Gruppen Rituximab, Tocilizumab, TNF α -Blocker, MTX. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

	N	Mittelwert	SD	SF	Minimum	Maximum
Rituximab	17	57,47	14,379	3,487	32	84
Tocilizumab	14	52,50	9,230	2,467	37	68
TNF α -Blocker	15	51,40	10,796	2,787	22	68
MTX	17	54,24	15,385	3,731	22	72
Total	63	54,05	12,809	1,614	22	84

3.7.1 Pulswellengeschwindigkeit und die antirheumatischen Medikamente

Von den 63 Patienten bei denen zu Beginn PWV und ALX@75 bestimmt wurde, haben noch 55 Patienten sechs Monate später an der Studie teilgenommen und ließen bei sich diese Parameter nochmals untersuchen. Es konnte bei allen Probanden, die vom Gerätehersteller geforderten Qualitätsmerkmale der Messergebnisse eingehalten werden. Laut den Richtlinien der Europäischen Gesellschaften für Kardiologie und Hypertonie (ESC/ESH) von 2007 führt eine Carotis-Femoralis PWV von > 12 m/s zu einem hohen Risiko für einen Endorganschaden (Roudier 2006). Sieben Patienten wiesen eine erhöhte PWV auf, dies ließ sich aber auch durch einen bereits vorhandenen Endorganschaden in Form von KHK, Niereninsuffizienz oder Diabetes mellitus erklären. Somit korrelierte es auch mit deren hohem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen berechnet nach dem FS. Es ergab sich, wie bereits beschrieben, eine positive Korrelation zwischen FS und PWV ($p < 0,0001$; $r = 0,591$).

Innerhalb der Studienzeit kam es aber zu keiner signifikanten Veränderung in der PWV, weder für das gesamte Patientenkollektiv ($p = 0,537$) noch nach der Betrachtung der Medikamentengruppen einzeln. Außerdem gab es auch keine signifikanten Unterschiede bei der Gefäßsteifigkeit im Verlauf zwischen Tocilizumab, Rituximab, TNF α Blocker, MTX im Vergleich dieser Therapeutika untereinander (siehe Tabelle 23/24).

Tabelle 23: PWV im Verlauf der Studienzeit unter dem Einfluss der antirheumatischen Therapeutika.

PWV Zeitpunkt	N	MW	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Signifikanz (p)
				Untergrenze	Obergrenze	
1	55	8,327	0,385	7,554	9,101	0,537
2	55	8,657	0,346	7,964	9,351	

Tabelle 24: Veränderungen von PWV [m/s] im Laufe der sechs Monate einzeln für Rituximab, Tocilizumab, TNF α -Blocker, MTX. Keine Signifikanzen innerhalb der sechsmonatigen Therapie ersichtlich.

Medikation	PWV	N	MW	SD	P
Rituximab	Zeitpunkt 1	15	8,153	2,318	0,119
	Zeitpunkt 2		9,433	2,974	
Tocilizumab	Zeitpunkt 1	13	7,538	1,731	0,177
	Zeitpunkt 2		9,169	3,072	
TNF α -Blocker	Zeitpunkt 1	12	9,05	3,089	0,542
	Zeitpunkt 2		8,4	2,141	
MTX	Zeitpunkt 1	15	8,567	3,745	0,457
	Zeitpunkt 2		7,627	1,782	

3.7.2 Augmentationsindex

Der Augmentationsindex eignet sich ähnlich wie die Pulswellengeschwindigkeit zur Abschätzung der kardiovaskulären Mortalität. In der Studie von Nürnberger et al. (2002) konnte eine positive Korrelation zwischen dem steigenden Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Augmentationsindex festgestellt werden. Alx hat eine höhere Sensibilität als PWV bei der Erfassung von frühen arteriellen Gefäßveränderungen.

Alx unterliegt einer Beeinflussung durch Faktoren wie Alter, Körpergröße, Herzfrequenz, Geschlecht, Herzfunktion, Blutdruck, kardiovaskuläre Risikofaktoren (Rauchen, Adipositas etc.) und Medikamente.

Um die Daten trotzdem untereinander vergleichen zu können, wird in dieser Studie für die weiteren Berechnungen anstatt Alx Alx@HR75 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um den Alx-Wert, der von der SphygmoCor® Software automatisch auf eine Herzfrequenz von 75 Schlägen pro Minute umgerechnet wird. Somit ist eine der Einflussgrößen berücksichtigt worden. Das individuelle Alter der

Patienten wird vernachlässigt, da wie in der Tabelle 22 bereits gezeigt wurde, ist die Altersverteilung der Probanden in den jeweiligen Medikamentengruppen ähnlich und zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Weder für das gesamte Patientenkollektiv ($p = 0,550$) im Laufe der Studienzeit noch nach der Betrachtung der Medikamentengruppen einzeln gab es signifikante Veränderung im Alx. Außerdem ließen sich auch keine signifikanten Unterschiede im Verlauf zwischen Tocilizumab, Rituximab, Etanercept/Adalimumab, MTX im Vergleich dieser Therapeutika untereinander feststellen.

Tabelle 25: Alx@HR75 im Verlauf der Studienzeit unter dem Einfluss der antirheumatischen Therapeutika.

ALX@HR75		Mittelwert	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		P
Zeitpunkt				Untergrenze	Obergrenze	
	1	25,773	1,507	22,747	28,798	0,55
	2	26,546	1,359	23,818	29,275	

Tabelle 26: Augmentationsindex im Laufe von sechs Monaten im Vergleich der vier Medikamentengruppen untereinander.

Medikation	ALX@HR75	N	MW	SD	95%-Konfidenzintervall		p
					Min.	Max.	
Rituximab	Zeitpunkt 1	15	29,667	10,376	23,9	35,434	0,381
	Zeitpunkt 2		27,133	9,841	21,933	32,334	
Tocilizumab	1	13	28,308	10,719	22,113	34,502	0,853
	2		27,769	10,481	22,183	33,355	
TNF α -Blocker	1	12	23,583	11,253	17,136	30,031	0,334
	2		26,083	7,537	20,269	31,898	
MTX	1	15	21,533	12,053	15,766	27,3	0,092
	2		25,2	11,447	20	30,4	

3.7.3 PWV, ALX und Framingham Score

Es zeigen sich hochsignifikante Unterschiede bei der Pulswellengeschwindigkeit bezüglich des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen. Patienten mit einem hohen Risiko wiesen deutlich höhere PWV-Werte im Vergleich zu den Probanden mit einem niedrigen Risiko ($p < 0,001$) auf (siehe Abbildung 27).

PWV und Framingham Score

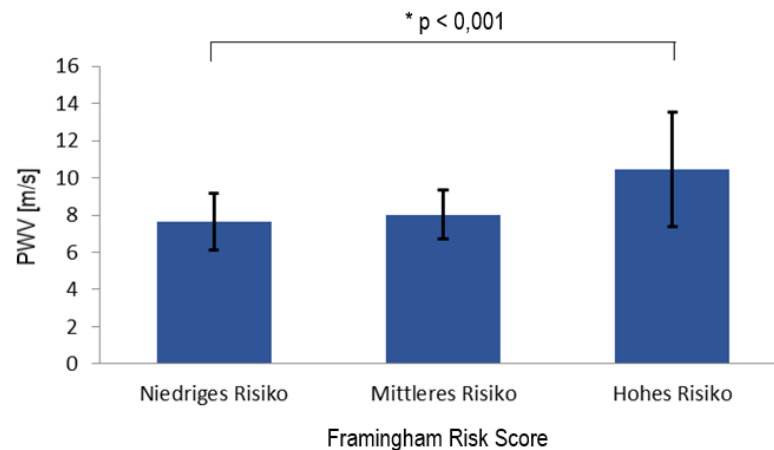


Abbildung 27: Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulären Risiko (berechnet mittels Framingham Score) und PWV.

Es zeigen sich auch Tendenzen zwischen dem niedrigen und mittleren sowie mittleren und hohen Risiko. Solch eine Korrelation bestätigt, dass bei einem vorgeschädigten Gefäß höhere PWV zu erwarten ist. Die Gefäßschädigungen, im Sinne des kardiovaskulären Ereignisses oder äquivalenter Erkrankungen, gehen mit einem hohen FS einher. Der F-Test der einfaktoriellen ANOVA bestätigt einen signifikanten Gruppenunterschied bei der PWV ($p < 0,001$) in Bezug auf FS. Hinsichtlich des Alx und des kardiovaskulären Risikos konnten wir keinen Zusammenhang nachweisen ($p = 0,757$).

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulären Risiko (berechnet mittels Framingham Score) und der Pulswellengeschwindigkeit bzw. dem Augmentationsindex.

Framingham Score		N	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
PWV (m/s)	niedriges Risiko	29	7,65	1,51	4,9	11,2
	mittleres Risiko	3	8,03	1,3	6,7	9,3
	hohes Risiko	20	10,45	3,07	6,5	16,2
	Gesamt	52	8,75	2,59	4,9	16,2
AlxHR75 (%)	niedriges Risiko	29	26,86	9,79	5	44
	mittleres Risiko	3	30,33	6,66	23	36
	hohes Risiko	20	25,95	9,56	10	46
	Gesamt	52	26,71	9,46	5	46

4 Diskussion

4.1 Vorstellung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen bestimmter *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) auf das kardiovaskuläre System, im Hinblick auf die Atherosklerose, bei den Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu untersuchen. Als mögliche Größen, die dem Einfluss unterliegen könnten, wurden die im Blut zirkulierenden Endothelvorläuferzellen, Gefäßwachstumsfaktoren im Serum (VEGF, Ang1, Ang2, SDF1) und die Gefäßsteifigkeit mittels klinischer Messung durch Sphygmocor erfasst und analysiert.

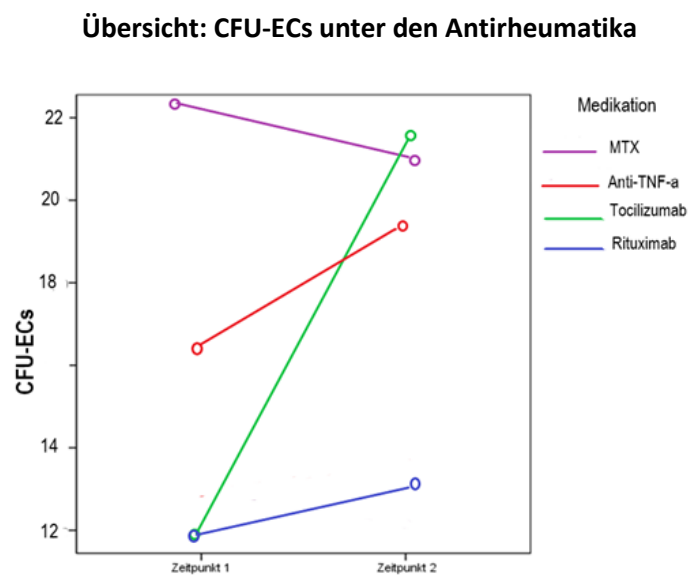


Abbildung 28: Das Verhalten von CFU-ECs innerhalb der Studienzeit unter der jeweiligen antirheumatischen Therapie.

Die Endothelvorläuferzellen werden als Marker für das kardiovaskuläre Risiko und die Endothelzellfunktion eingesetzt. Sie reagieren sehr sensibel auf Veränderungen und unterliegen intrinsischen sowie extrinsischen Einflussfaktoren. Von den vier, in dieser Forschungsarbeit, untersuchten Medikamentengruppen konnte allein bei den Patienten, die mit Tocilizumab behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg der *colony-forming Units* (CFU) im Laufe der sechs Monate nachgewiesen werden. Keines der anderen Medikamente hat zu einer nennenswerten Änderung in der Anzahl der CFU geführt. Patienten, die mit MTX behandelt wurden, hatten insgesamt eine höhere Anzahl an CFU-ECs als die Rituximab-Gruppe.

Unterschiedliche Parameter wie die Einnahme der Antihypertensiva, das Vorhandensein von CCP-Ak oder ein hohes kardiovaskuläres Risiko, errechnet mittels Framingham Score, hatten signifikante

Auswirkungen auf die Anzahl der CFU-ECs. Signifikant niedrigere Werte wurden bei Patienten mit positivem CCP-Ak, hohem Framingham Score und arterieller Hypertonie erfasst. Dies entspricht auch dem heutigem Stand der Wissenschaft in Bezug auf die Einflussgrößen wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck (Delva et al. 2007).

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis könne im Laufe der Zeit zu einer Ausprägung der Atherosklerose führen. Zur Erfassung des arteriellen Status wurden die Gefäßelastizität und der aortale Blutdruck mittels der Pulswellengeschwindigkeit gemessen. Es kam zu keiner messbaren Änderung der arteriellen Gefäßsteifigkeit im Laufe der sechs Monate in keiner der Medikamentengruppen. Am ehesten dadurch bedingt, dass solch feine Veränderungen im Gefäßstatus durch eine tonometrische Messung nicht ausreichend erfasst werden können. Atherosklerose ist ein langwieriger Prozess und entsteht über Jahre. Da unsere Studie einen Zeitraum von sechs Monaten erfasst, ist es nicht verwunderlich, dass in diesem Zeitintervall keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßsteifigkeit in den jeweils vier Medikamentengruppen festgestellt werden konnte. Trotzdem konnten wir eine positive Korrelation zwischen der Pulswellengeschwindigkeit und dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in den nächsten zehn Jahren aufzeigen. Hierbei hatten Patienten mit erhöhtem Risiko, berechnet mit dem Framingham Score, höhere PWV-Werte. Dies kann einerseits durch die bereits vorliegende Atherosklerose bedingt sein, oder durch Komorbidität der Patienten, die Einfluss auf die Berechnung des Framingham Scores haben und einen direkten Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose. Hierzu zählen unter anderem Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus.

Übersicht: DAS28 unter den Antirheumatika

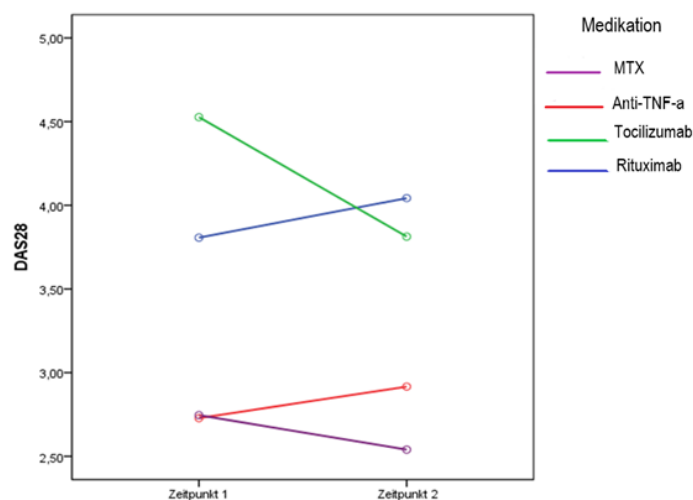


Abbildung 29: DAS28 im Laufe der Studienzeit unter der jeweiligen antirheumatischen Therapie.

Zog man die aktuelle rheumatische Krankheitsaktivität der Probanden in Betracht, erfasst mittels DAS28, so wiesen Patienten mit mittlerer bzw. hoher Krankheitsaktivität signifikant höhere PWV-Werte als Patienten in Remission bzw. niedriger Krankheitsaktivität auf. Zu erwähnen sei, dass beim Vergleich der Medikamentengruppen untereinander erhöhte DAS28-Werte bei Rituximab und Tocilizumab vorgelegen haben. Der signifikante Unterschied von Rituximab bzw. Tocilizumab zu den TNF α -Blockern und zu MTX im Hinblick auf die Krankheitsaktivität lässt sich dadurch erklären, dass sowohl Rituximab als auch Tocilizumab nur bei vorherigem Versagen der anderen Therapeutika, gemessen zum Teil auch an höherer Krankheitsaktivität, eingesetzt werden. Es liegt auch nicht der Beginn einer Therapie am Startpunkt der sechs Monate, sondern es wurden zum Teil schon laufende Therapien erfasst. Anhand dessen lässt sich auch die veränderte Gefäßelastizität mit progredient krankhaften Veränderungen des Gefäßstatus im Sinne einer Atherosklerose erklären.

Bei chronischen Erkrankungen wie Atherosklerose und Rheumatoide Arthritis kommt es zu einer pathologischen Gefäßproliferation. Bei RA läuft die Angiogenese beispielsweise in der Synovialmembran der entzündeten Gelenke ab. Hierbei führen unterschiedliche Stimuli zu einer Ausschüttung der Gefäßwachstumsfaktoren sowie Chemokine, die ihrerseits sowohl autokrin als auch parakrin die Zelldifferenzierung beeinflussen. Bei den untersuchten Gefäßwachstumsfaktoren und Chemokinen ließ sich zwar ein signifikanter Anstieg bei den Erkrankten im Vergleich mit einer gesunden Kohorte erfassen, gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Medikamentengruppen im Laufe der sechs Monate. Die Ausnahme bildete SDF-1 mit einem Abfall der Serumkonzentration bei Rituximab, Tocilizumab und MTX während der Studienzeit. Beim Vergleich der Gruppen untereinander zeigten Patienten, die mit Anti-TNF α behandelt wurden, höhere Ang-1-Konzentrationen als die Rituximab- bzw. Tocilizumab-Gruppe. Außerdem hatten auch begleitende Therapien Auswirkungen auf die Serumspiegel. So wiesen Erkrankte, die zusätzlich mit Prednisolon therapiert wurden, höhere SDF-1-Werte auf. Die Behandlung mit Antihypertensiva führte zum Anstieg der Ang-1-Spiegel.

So vielseitig diese Ergebnisse auch sind, zeigen sie womöglich einen neuen Ansatzpunkt in der erfolgreichen Behandlung der RA und der daraus resultierenden Atherosklerose. Mit weiterer Erforschung der RA-Pathogenese und der Auswirkung, der heute im Einsatz befindlichen Therapeutika, eröffnen sich immer mehr Angriffspunkte bei diesen chronischen Erkrankungen. Aufgrund zum Teil ähnlicher pathophysiologischer Abläufe bei RA und der Atherosklerose könnte man vielleicht mithilfe der richtigen Therapie eine Entwicklung der kardiovaskulären Ereignisse vorbeugen.

Laut einer Metaanalyse von 2008, in der Daten aus 24 Observationsstudien ausgewertet wurden, ist das Risiko für eine kardiovaskuläre Mortalität bei den RA-Patienten etwa 50 % höher als in der Normalpopulation (meta-SMR 1,50; 95 % KI 1,39-1,61). Es wurde eine 59 %-ige Zunahme des

Mortalitätsrisikos durch die ischämische Herzkrankheit und 52 %-ige Zunahme durch die zerebrovaskulären Komplikationen beschrieben. Im Gegensatz zur Normalpopulation ist die Wahrscheinlichkeit bei den RA-Patienten ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden geschlechtsunspezifisch (Aviña-Zubieta et al. 2008). Das relative Infarktisiko ist bei den weiblichen RA-Patienten drei Mal so hoch wie bei den Gesunden (Solomon et al. 2003).

2018 erschien eine neue Studie bezüglich der antirheumatischen Therapie und ihrer Auswirkung auf das kardiovaskuläre Risiko. Die südkoreanische Studie mit Erfassung von über 137.000 Patienten mit RA von 2009 bis 2016 zeigte die Folgen der Glukokortikoid-, DMARD- und NSAID-Behandlung auf das Risiko der Entwicklung der KHK sowie des ischämischen und hämorrhagischen Insults. So wurden die Erkenntnisse über eine Steigerung des kardiovaskulären Risikos unter der NSAID-Therapie erneut bestätigt. Zusätzlich wurde bei gleichzeitiger Behandlung mit nichtselektiven NSAIDs und COX2-Inhibitoren eine Risikoerhöhung für ischämische und hämorrhagische Insulte festgestellt. Ebenfalls zeigte sich bei der Langzeiteinnahme von Glukokortikoiden ein potenzielles Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, wobei Kurzzeitgaben eher das Risiko herabsetzten. Eine positive Auswirkung auf die extraartikuläre Manifestation durch die Biologicals wie Rituximab oder Tocilizumab konnte aufgrund einer kleinen Kohorte nicht ausreichend nachgewiesen werden. Die Behandlung mit anti-TNF α zeigte jedoch eine protektive Wirkung (Cho et al. 2018).

Die vorliegende Doktorarbeit soll den Zusammenhang zwischen den Biologicals und deren möglichem Einfluss auf die Atherosklerose zeigen.

4.2 Methotrexat und TNF α -Blocker

In den letzten Jahren kam es zu einem großen Fortschritt in der Therapie der RA durch ein wachsendes Angebot an den Substanzklassen, die eingesetzt werden können. Somit stieg auch das Interesse, ob diese Therapien nicht auch womöglich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen senken können. So ergab zum Beispiel die Metaanalyse von Westlake et al. (2010), dass MTX zu einer Risikoverminderung für das Auftreten kardiovaskuläre Erkrankungen beiträgt (Westlake et al. 2010). Außerdem zeigte eine von Choi et al. (2002) großangelegte prospektive Kohortenstudie mit 1240 an RA erkrankten Teilnehmern, dass es zu einer Reduktion der Mortalitätsrate um 60 % und vor allem zu einer Senkung der Letalität kardiovaskulärer Ursache um 70 % bei Probanden, die mit MTX behandelt wurden im Gegensatz zu denen, die andere Basistherapeutika erhielten, gekommen ist.

Einerseits konnten wir keinen signifikanten Anstieg in der Anzahl der CFU-ECs bei den Patienten, die mit MTX behandelt wurden, nachweisen. Andererseits wiesen Patienten aus der MTX-Gruppe, zu Beginn und auch nach sechs Monaten, eine viel höhere Anzahl von EPCs als Patienten mit

Rituximab auf. Womöglich ist es auf die antiatherogene Wirkung und einen insgesamt leichteren Verlauf der Erkrankung, der mit MTX behandelten Patienten zurückzuführen. Eine positive Auswirkung von MTX auf das kardiovaskuläre System, bewiesen durch bereits oben erwähnte Studien, ist nicht außer Acht zu lassen.

MTX hat einen positiven Effekt auf die Endothelfunktion und die Homöostase durch die Hemmung der proatherosklerotischen Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6. Dies wird entweder direkt über MTX oder durch die Aktivierung von Adenosinrezeptoren bewirkt (Mangoni et al. 2017). Reiss et al. (2008) zeigten im Zellmodell eine Umkehr des Cholesteroltransports mittels Aktivierung der Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren und eine Unterdrückung der Schaumzellbildung in der THP-1-Makrophagen. Bei der Untersuchung der Karotis-Intima-Media-Dicke bei den RA-Patienten und einer gesunden Kohorte wurden signifikant höhere Intimadicken bei den Erkrankten erfasst. Innerhalb unterschiedlicher DMARD-Therapien wurde ausschließlich unter der MTX-Behandlung eine signifikant niedrigere Dicke beobachtet. Solch eine nichtinvasive Messung gibt einen Aufschluss über die Atherosklerose und das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung (Kim et al. 2015).

Aufgrund der kurzen Studienzeit konnte unsererseits keine Veränderung in der Gefäßsteifigkeit, ermittelt durch PWV, nachgewiesen werden. Jedoch ließ sich eine Tendenz erkennen. Die Patienten aus der MTX-Kohorte waren eher in die Gruppe mit der niedrigeren Krankheitsaktivität einzuordnen. Die PWV war, wie erwartet, bei mittlerer und höherer Krankheitsaktivität erhöht. Somit lässt sich eine Parallele zu den Arbeiten von Kim (2015) ziehen.

Bei den TNF α -Blockern wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Durch eine direkte Wirkung auf das Endothel mittels Hemmung der Zytokinausschüttung kommt es zur Normalisierung der endothelabhängigen Vasodilatation und somit zur Reduktion der kardiovaskulären Letalität (Aviña-Zubieta et al. 2008). Außerdem wird die antiatherogene Wirkung durch Reduktion der Intimadicke, ähnlich wie bei MTX, aufgrund entzündungshemmender Prozesse begünstigt (Del Porto et al. 2007).

4.3 Tocilizumab im Hinblick auf CFU-ECs und PWV

Das besondere an der Wirkung von Tocilizumab ist die Hemmung des IL-6-Signalweges durch die Bindung an den IL-6-Rezeptor. Unter einer großen Anzahl von Zytokinen, die von den aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen synthetisiert werden, spielt eine der Schlüsselrollen in der Entstehung der RA sowie der kardiovaskulären Erkrankungen das IL-6. Die Dysbalance zwischen den pro- und den antiinflammatorischen Zytokinen begünstigt die Entstehung der Atherothrombose durch Endotheldysfunktion, Vasokonstriktion, Veränderung der Lipidstruktur, Hyperkoagulation (Brennan und McInnes 2008; Pasqui et al. 2006).

Eine Steigerung von IL-6 korreliert mit dem Risiko der Progression einer kardiovaskulären Erkrankung. Außerdem ist eine Erhöhung von IL-6 mit einer negativen Prognose bei einer instabilen Angina pectoris und Myokardinfarkt gekoppelt (Danesh et al. 2008). Seino et al (1994) haben festgestellt, dass durch die Atherosklerose geschädigte Gefäße eine 10- bis 40-fach höhere Expression an IL-6-mRNA zeigten als gesunde Arterien. Auf vielerlei Wegen kommt es durch hohe IL-6-Spiegel zur Instabilität der atherosklerotischen Plaques sei es durch die Veränderung der Hämostase (Tokunou et al. 2001) oder unter anderem durch das Eingreifen in die Kollagensynthese (Zhang et al. 2012).

Auch hier untersuchten wir den Gefäßstatus der RA-Patienten mittels tonometrischer Messung und der Ermittlung der Endothelvorläuferzellen. Es konnten zwar keine signifikanten Veränderungen bei der PWV-Messung erfasst werden, jedoch zeigte sich ein Anstieg in der Anzahl der CFU-ECs im Laufe von sechs Monaten.

Fan et al. (2007) wiesen eine Expression der IL-6R bei den CFU-EPCs nach. Die Funktionen des IL-6R sind vielseitig, er ist nicht nur ein Zeichen fokaler Entzündungen, sondern kann auch die Angiogenese vermitteln. IL-6 induziert den gp80/gp130 Signalweg in den EPCs und begünstigt eine EPC-Proliferation, -Migration und eine Ausdifferenzierung der EPCs zu gefäßähnlichen Strukturen in vitro. Gleichzeitig kam es zu einer geminderten Migration der EPCs durch die Hemmung der IL-6-Rezeptoren.

Somit ist es eher überraschend eine signifikant höhere Anzahl an EPCs nach sechsmonatiger Behandlung mittels Tocilizumab vorzufinden. Jedoch muss man berücksichtigen, dass EPCs durch eine Vielzahl an Faktoren angeregt werden. Darunter sind solche wie Makrophagen, SDF -1, VEGF, Stickstoffoxid (NO), Zytokine, Östrogene, high density lipoprotein (HDL), Erythropoetin und viele weitere. Es sind noch nicht alle die Proliferation und Migration der EPCs anregenden Substanzen erforscht worden.

Eine Steigerung der EPCs unter Tocilizumab ist unter anderem auf ein Metabolit der Arachidonsäure, die 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) zurückzuführen. 20-HETE hat Auswirkung auf das Herz-Kreislaufsystem durch Regulation des Blutdrucks und der Organdurchblutung. Metabolisiert wird es seinerseits durch das Cytochrom CYP450-4A.

Die Europäische Arzneimittel Agentur (EMA) hat in Bezug auf Tocilizumab veröffentlicht, dass es durch die Hemmung von IL-6 zu einer Normalisierung der hepatischen Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) kommt. In vitro Studien haben gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen von IL-6 zu einer Unterdrückung der CYP450 Expression führen (Siewert et al. 2000; Fukuda et al. 1992).

Somit kommt es unter anderem zu einer Normalisierung der 20-HETE-Spiegel. Studien haben gezeigt, dass 20-HETE die Phosphorylierung von VEGF und Hypoxie-induzierter-Faktor-1 α (HIF-1 α)

stimuliert, welche, wie bereits oben erwähnt, zur Stimulation der EPCs führen. Außerdem regt 20-HETE auch direkt die Endothelzellproliferation sowie Migration an (Guo et al. 2007; Guo et al. 2009). Des Weiteren haben Guo et al. (2011) EPCs aus der menschlichen Nabelschur isoliert und nachgewiesen, dass diese mRNA und Proteine für CYP4A11 und CYP4A22 Enzyme exprimieren und bei Vorhandensein von Arachidonsäure 20-HETE synthetisieren. Durch das zusätzlich exogen zugeführte 20-HETE kam es zur Proliferation und Migration von EPCs und Ausprägung von gefäßähnlichen Strukturen in der Gelmatrix.

Diese Ergebnisse lassen Schlüsse auf die Resultate der vorliegenden Forschungsarbeit ziehen. Die Aktivierung von EPCs ist ein sehr komplexer und vielseitiger Prozess, der noch nicht ausreichend erforscht ist. Anhand heutiger Studienlage ist die signifikant höhere Anzahl von EPCs bei der Tocilizumab-Therapie unter anderem über die Reaktivierung von CYP450 und der daraus resultierenden Kaskade über das CYP4A/F-20-HETE System zu erklären. Womöglich sind noch weitere Prozesse involviert, jedoch bleibt dies der Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Swerdlow et al. (2012) untersuchten ihrerseits inwiefern sich die Hemmung des IL6-Rezeptors (IL6R) durch Tocilizumab positiv auf die koronaren Herzerkrankungen auswirkt. Sie verglichen den Tocilizumab-Effekt und eine genetische Varianz des IL6R-SNP (rs7529229), die mit höheren IL-6-Konzentrationen, niedrigeren CRP und Fibrinogen-Spiegeln einhergeht und infolgedessen mit einem niedrigeren Risiko für KHK assoziiert ist. Hierbei kamen sie zu ähnlichen Ergebnissen wie in der vorliegenden Forschungsarbeit, dass eine Blockade des IL6R eine entscheidende Rolle in der KHK-Hemmung spielt.

All diese Beobachtungen zeigen, dass es außer der entzündungshemmenden Wirkung auch weitere substanzspezifische Mechanismen der DMARDs gibt, die einen positiven Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko haben. Neuere Studien haben beispielsweise gezeigt, dass durch die Blockade des IL6R, Tocilizumab in Zukunft womöglich als anti-atherosklerotisches Mittel fungieren könnte (Swerdlow et al. 2012; Patschan et al. 2014).

4.4 Rituximab

Bezüglich Rituximab und deren kardiovaskulärer Auswirkung gibt es keine eindeutige Studienlage. So zeigte zum Beispiel eine Studie von Mathieu et al. (2012) keine Veränderungen der Gefäßsteifigkeit im Verlauf von sechs Monaten und einem Jahr unter der Rituximab-Therapie. Andererseits wird von Raterman et al. (2013) ein günstiger Einfluss von Rituximab auf die HDL-Struktur im Laufe von sechs Monaten verzeichnet.

In dieser Forschungsarbeit konnte keine signifikante Veränderung bei den HDL-Spiegeln während der Studienzeit beobachtet werden. Jedoch waren die HDL-Konzentrationen bei den Patienten, die mit Rituximab behandelt wurden deutlich höher als bei denen, die Tocilizumab erhielten. Ähnlich wie bei Mathieu et al. (2012) konnten keine signifikanten Änderungen im Gefäßstatus mittels tonometrischer Messungen nachgewiesen werden.

4.5 Begleitmedikation NSAR und Antihypertensiva

Außer der traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren spielen bei RA sowohl die Nebenwirkungen der medikamentösen antiinflammatorischen Therapie als auch die immunologischen und entzündlichen Prozesse der Erkrankung selbst eine wichtige Rolle (Maradit-Kremers et al. 2005b). Zu den Medikamenten mit einer kritischen Auswirkung auf die Hämodynamik als Kurzzeit- und die Ausprägung der Atherosklerose als Langzeittherapie zählen unter anderem die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und die Glukokortikoide.

NSAR können bei Patienten mit vorbestehender arterieller Hypertonie zu einer weiteren Verschlechterung des Blutdrucks führen. Hierzu kommt es vor allem bei einer simultanen ACE-Hemmer- bzw. β -Blocker-Therapie. Eine der jüngsten Meta-Analysen an über einer halben Million Patienten zeigte, dass alle NSAR das Risiko eines Myokardinfarkts signifikant steigern. NSAR entfalten ihre Wirkung über die Hemmung von COX. Die analgetische sowie antiinflammatorische Wirkung wird durch die COX2-Blockade hervorgerufen. Die COX1-Hemmung führt zu den gastrointestinalen bzw. renalen unerwünschten Nebenwirkungen. Somit begünstigt die COX-Hemmung die kardiovaskulären Ereignisse. Durch die Prostaglandin-E2 (PGE2)-Hemmung in der Niere kommt es zur Natrium- und Wasserretention und somit zu hohem Blutdruck. Die Prostaglandin-I2 (PGI2)-Hemmung hat als Folge eine erhöhte Thrombogenese. Hierzu gab es eine Studie an über 24.000 Patienten mit arthritischen Erkrankungen, die mit NSAR (Celecoxib, Naproxen oder Ibuprofen) 20 Monate lang behandelt wurden. Die PRECISION-Studie zeigte kaum einen Unterschied zwischen den drei Studienarmen, dem COX2-Inhibitor (Celecoxib) und den beiden nichtselektiven NSAR, bezüglich der Häufigkeit der kardiovaskulären Komplikationen (Pepine und Gurbel 2017; Nissen et al. 2016). Außerdem induzieren NSAR die *reactive oxygen species (RSO)* in den Myokardzellen und rufen somit eine kardiotoxische Reaktion durch Mitochondriendysfunktion hervor (Ghosh et al. 2015).

Diesen Erkenntnissen entsprechend waren auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Patienten, die keine nichtsteroidalen Antirheumatika zusätzlich bekommen haben, hatten eher ein geringes Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten zehn Jahren zu erleiden. Studienteilnehmer mit NSAR-Behandlung waren in die mittlere bis hohe Risikogruppe einzustufen. Eine ähnliche

Verteilung gab es auch bei der antihypertensiven Therapie. Patienten ohne einen bekannten Hypertonus und somit ohne blutdrucksenkende Medikamente gehörten zur Gruppe mit einem geringen Risiko. Ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, ähnlich wie in der Normalbevölkerung, bestand bei den Hypertonikern auch unter Therapie.

Interessant war der Zusammenhang zwischen der antihypertensiven Therapie und der Krankheitsprogredienz. Diejenigen, die an Bluthochdruck litten, waren bezüglich der Krankheitsaktivität, erfasst mittels DAS28, eher in die mittlere und hohe Krankheitsaktivität einzuordnen ($p = 0,020$). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von der Studie von Panoulas et al. (2007), wo kein Zusammenhang zwischen DAS28 und Patienten mit und ohne Bluthochdruck festgestellt werden konnte.

Betrachtet man das gesamte Patientenkollektiv, so lassen sich signifikante Unterschiede in der EPC-Proliferation im Hinblick auf die Einnahme der Antihypertensiva, das Vorhandensein von CCP-Ak oder der Einteilung in die jeweilige Risikogruppe nach Framingham Score feststellen. Hierbei lässt sich erkennen, dass eine niedrigere Anzahl von EPCs bei Patienten gefunden wurde, die mit Antihypertensiva behandelt wurden, die CCP-Ak positiv waren oder ein hohes kardiovaskuläres Risiko nach Framingham hatten. Zusammenfassend kann man sagen, dass all diese Faktoren ein schlechteres prognostisches Risiko in Bezug auf die Atherosklerose beherbergen, sei es aufgrund von einem fortgeschrittenen RA-Stadium oder weiteren Nebenerkrankungen. Dies schlägt sich in der EPC-Proliferation nieder und lässt ein niedrigeres Potenzial zur Gefäßregeneration erkennen.

4.6 Lipidspiegel unter der antirheumatischen Therapie

Anhand heutiger Studienlage ist es erkennbar, dass die anti-TNF α -, Tocilizumab- sowie Rituximab-Therapien einen direkten Einfluss auf die Lipidspiegel im Serum bei RA haben. So zeigte sich beispielsweise unter Etanercept, Adalimumab und Rituximab am ehesten eine anti-atherogene Wirkung bezüglich der Lipidwerte. Unter Tocilizumab kam es eher zu einer kurzfristigen Verschlechterung, Langzeitstudien hierzu fehlen noch.

Vergleichbar mit anderen Studien ergab sich im Verlauf von sechs Monaten ein Anstieg von LDL in der Tocilizumab Gruppe. Dies erklären Strang et al. (2013) durch eine mögliche direkte Einwirkung von Tocilizumab auf die Leber und veränderte Expression von LDL-Rezeptoren in der Leber.

Studien wie SAMURAI und LITHE zeigten einen allgemeinen Lipidanstieg (Gesamtcholesterol, HDL, LDL, Triglyceride) unter der Tocilizumab-Therapie (Kawashiri et al. 2011; Schiff et al. 2011). Jedoch führte eine zeitgleiche Gabe von Statinen zu einem positiven Effekt auf die Lipidspiegel im Blut. Statine können mittels ihrer pleiotropen Wirkung, darunter auch eine Senkung des IL-6-Spiegels,

die Ausprägung der Atherosklerose verlangsamen und sich positiv auf den Verlauf von RA auswirken (Lopnow et al. 2011).

Es ist bekannt, dass bestimmte Faktoren, die zu einer Minimierung des kardiovaskulären Risikos führen, wie z. B. Statine oder sportliche Aktivität zu einem Anstieg der EPCs führen und somit die Endothelregenerierung fördern. Statine steigern nicht nur die Anzahl sondern auch die Funktion der EPCs in vitro sowie im Mausmodell und bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK) (Georgiou et al. 2012; Hansen et al. 2006). Da in dieser Studie nur sieben Patienten einer Therapie mit Statinen unterzogen wurden, gab es keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der EPCs.

Beim paarweisen Vergleich haben wir eine Besonderheit bei den Triglycerid-Serumspiegeln festgestellt. Hierbei waren die Konzentrationen bei der Tocilizumab-Gruppe signifikant höher als bei den Patienten, die mit MTX oder anti-TNF α behandelt wurden. Womöglich ist dieser Unterschied auf ein fortgeschrittenes Stadium der RA und das Versagen anderer Therapiemöglichkeiten in der Tocilizumab-Gruppe sowie eine durch das Medikament bedingte Veränderung der Lipidspiegel mit steigender atherogener Tendenz zurückzuführen.

Die Auswirkungen der antirheumatischen Therapie auf die Lipidspiegel und somit ein erhöhtes Potenzial für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses sind nicht außer Acht zu lassen. Eine regelmäßige Serum-Kontrolle sowie der rechtzeitige Beginn einer Statintherapie sind bei der Behandlung der RA als protektive Maßnahmen zur Vorbeugung der Atherosklerose von großer Bedeutung.

4.7 Gefäßwachstumsfaktoren und Chemokine unter antirheumatischer Therapie

Neben der tonometrischen Messung sowie der Bestimmung der EPCs wurden unter anderem Gefäßwachstumsfaktoren im Zeitintervall von sechs Monaten bestimmt. Diese spielen eine unabdingbare Rolle in der Pathogenese der RA sowie der Atherosklerose.

Wie erwartet, wurden beim Vergleich einer gesunden Kohorte mit der RA-Kohorte vielfach höhere Konzentrationen an VEGF und Angiopoetin-1 bei den Erkrankten gemessen, wohingegen SDF-1 niedrigere Serumkonzentration bei den Erkrankten aufwies als bei den Gesunden.

4.7.1 VEGF

Einer der Hauptstimuli für die aggressive Proliferation der Synovialzellen sind proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α . Ihre synergetische Wirkung induziert die Fibroblasten zur

Hyperexpression von VEGF. Laut einer Studie von Nakahara et al. (2003) inhibiert eine Therapie mit IL-6-Antikörpern die Synthese von VEGF. In der vorliegenden Forschungsarbeit ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied bei den VEGF-Spiegeln im Verlauf von sechs Monaten bei den Patienten, die mit Tocilizumab therapiert wurden. Jedoch konnte eine positive Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und VEGF festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Lee et al. (2001) in ihrer Studie mit 99 RA-Patienten. Die im Serum gemessenen VEGF-Spiegel hatten eine positive Korrelation zu CRP, BSG, RF und der Anzahl der geschwollenen Gelenke. Es gibt insgesamt vier bekannte Formen von VEGF – A, B, C, D. Der in den meisten Gewebearten vorkommende Faktor ist VEGF-A¹⁶⁵. Dieser wurde mittels ELISA sowohl von Lee et al. (2001) als auch in der vorliegenden Arbeit bestimmt. Neben der Stimulation der Endothelproliferation kann VEGF die Gefäßpermeabilität steigern, wodurch es zu Gelenkschwellungen bei den RA-Patienten kommt (Feng et al. 1999). Vergleichbare Daten lieferte die Studie von Harada et al. (1998) mit einer Korrelation zwischen CRP und VEGF im Serum.

Im Tiermodell führte die Inhibition von VEGF im Serum zur geminderten Gelenkschwellung sowie Gelenkdestruktion. Laut den Daten von Harada et al. (1998) konnte man eine direkte Korrelation zwischen der Besserung der klinischen Symptome der RA und dem fallenden VEGF-Serumspiegel sehen.

4.7.2 Angiopoetin-1

Neben VEGF wurden auch Angiopoetin 1 und 2 bestimmt. Hierbei waren die Ang-1-Spiegel der RA-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kohorte signifikant höher. Laut einer Studie von Scott et al. (2002) waren die Ang-1-Spiegel vor allem bei einem fortgeschrittenen Stadium der RA höher, wohingegen Ang-2 führend und 70- bis 120-fach erhöht war.

Vergleicht man die Medikamentengruppen untereinander, so stellt man einen signifikant höheren Ang-1-Serumspiegel bei den Patienten, die mit TNF α -Blockern behandelt wurden, im Gegensatz zu den Tocilizumab- bzw. Rituximab-Gruppen fest. Dies steht in einem Gegensatz zu der Arbeit von Kayakabe et al. (2012), in der die Hemmung von Ang-1 durch IL-6 beschrieben wurde. Die Einwirkung der Medikamenten sowie der Zytokine auf Ang-1 ist noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Forschungsarbeiten. Womöglich liegt aber auch die Abweichung in einer geringen Fallzahl begründet, da pro Medikamentengruppe jeweils zehn Patienten erfasst wurden.

4.7.3 Angiopoetin-2

In der vorliegenden Forschungsarbeit waren die Ang-2-Spiegel zwar erhöht im Vergleich zu der gesunden Kohorte, jedoch nicht signifikant. Auffallend war, dass die RA-Patienten, die zusätzlich unter einer arteriellen Hypertonie litten und mit Antihypertensiva behandelt wurden, signifikant

höhere Ang-2-Werte hatten als die RA-Patienten ohne eine bekannte Hypertonie. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch David et al. (2008) in ihrer Studie. Patienten, die mit Antihypertensiva wie Olmesartan und Pravastatin über zwölf Wochen lang behandelt wurden und gegebenenfalls bereits an einer Atherosklerose litten, wiesen auch weiterhin erhöhte Ang-2-Spiegel auf. Weitere Studien haben gezeigt, dass unter den Patienten mit arterieller Hypertonie erhöhte Ang-2-Werte einen prädiktiven Charakter für Myokardinfarkt hatten (Patel et al. 2009).

Ang-2 ist Gegenstand vieler Studien. Es wurde bereits ein Zusammenhang zwischen den hohen Spiegel und der Atherosklerose sowie chronischen entzündlichen Prozessen im Körper festgestellt. Nach der sechsmonatigen Therapie mit Antirheumatika konnte eine negative Korrelation zwischen Ang-2 und den EPCs nachgewiesen werden. Womöglich liegt die Ursache in einem geringeren Potenzial der Gefäße zur Mobilisierung der Stammzellen, bedingt durch den progredienten Befall dieser. Weiterhin liegt es gegebenenfalls an der Bindung von Ang-2 an die extrazelluläre Domäne von dem Tie-2-Rezeptor. Sowohl Ang-1 als auch Ang-2 binden mit derselben Affinität an den Tie-2-Rezeptor. Durch den Ang-1-Rezeptor-Komplex kommt es zur Autophosphorylierung, die ihrerseits die Endothelzellmigration fördert. Bei steigenden Ang-2-Spiegeln kommt es eher zur Bindung von Ang-2 an die Tie-2-Rezeptoren. Diese führt jedoch nicht zu einer Autophosphorylierung und somit nicht zu einer Endothelzellmigration. Ang-2 fungiert als Ang-1-Antagonist (Fiedler und Augustin 2006).

Ang-2 korreliert insgesamt mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Vorhandensein bzw. einem frühen Beginn eines extraartikulären Befalls in Form von kardiovaskulären Erkrankungen bei den RA-Patienten (Lopez-Mejias et al. 2013, Westra et al. 2011).

4.7.4 SDF-1

Übersicht: SDF-1 und die Antirheumatika

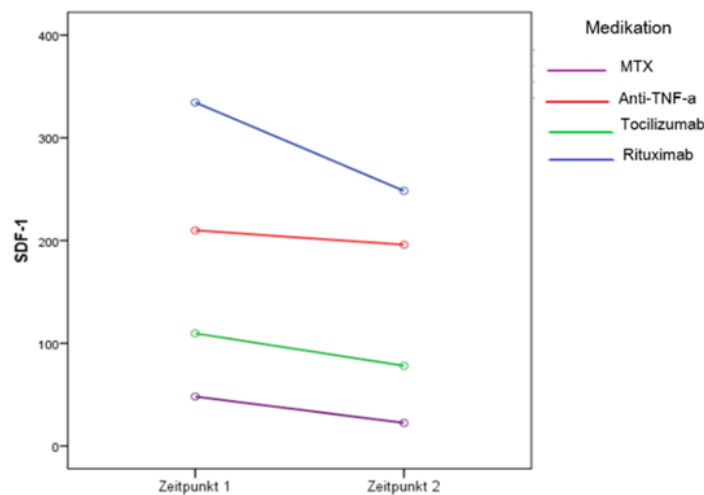


Abbildung 30: Das Verhalten von SDF-1 während der Studienzeit unter der jeweiligen antirheumatischen Therapie.

Zusätzlich wurden die SDF-1-Serumspiegel zum Zeitpunkt 0 und sechs Monate später bestimmt. Dieses Chemokin ist unter anderem an dem Entzündungsgeschehen bei RA und der Atherosklerose beteiligt. Es kann über die Stimulation der CD34⁺-Zellen eine Mobilisation der EPCs hervorrufen. In den bisherigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen den SDF-1-Spiegeln und der Krankheitsaktivität, Entzündungsparametern und Gelenksdestruktion nicht nachgewiesen werden. Die Patienten wiesen bei RA-Befall signifikant höhere SDF-1-Blutwerte als die gesunde Kohorte auf (Mittal et al. 2003). In der vorliegenden Forschungsarbeit hatten die RA-Patienten signifikant niedrigere Serumspiegel als die gesunde Kohorte. Außerdem war ein signifikanter Abfall von SDF-1 innerhalb von sechs Monaten unter der Therapie mit MTX, Rituximab und Tocilizumab zu verzeichnen. Studien an *knock-out*-Mäusen zeigten, dass Embryonen mit einem Mangel an SDF-1 oder CXCR4-Rezeptoren (CXCR4, auch als SDF-1-Rezeptor bekannt) mit dem Leben nicht kompatible Missbildungen am Knochenmark aufwiesen (Lapidot und Kollet 2002). CXCR4 werden an hämatopoetischen Stammzellen, Blutzellen und embryonalen Stammzellen exprimiert. Vielleicht ist die insgesamt niedrigere Anzahl an EPCs bei den RA-Patienten im Vergleich zu der gesunden Kohorte unter anderem auf eine niedrigere Bereitschaft dieser zur Migration, bedingt durch niedrige SDF-1-Spiegel, zurückzuführen.

Es ist bekannt, dass SDF-1/CXCR4 zu einem IL-6-Anstieg bei den RA-Patienten führt. Ob es eine Rückkopplung gibt und gegebenenfalls durch Tocilizumab indirekt SDF-1-Spiegel gesenkt werden, ist noch unbekannt. Durch die Stimulation der FLS und der Chondrozyten durch Chemokine werden

Entzündungsmediatoren wie Zytokine und MMPs freigesetzt. Dieser Prozess löst eine weitere Kaskade aus und hat als Folge eine Gelenkzerstörung (Iwamoto et al. 2008; Nanki et al. 2001).

Bezüglich der Auswirkung von Methotrexat auf die SDF-1-Spiegel gibt es unterschiedliche Forschungsergebnisse. MTX als bekanntes Chemotherapeutikum kann zu einer Knochenmarkschädigung führen. Anhand eines Tiermodells hat man nachgewiesen, dass MTX eine Reduzierung der Knochenmarkszelldichte hervorruft, die mit einem veränderten CXCL12 (SDF-1)-Spiegel und verminderter Expression von CXCR4-mRNA einhergeht. Die SDF-1-Werte waren im Blut zwar erhöht, aber deutlich niedriger im Knochenmark. Begleitend hierzu war die MMP-9-Expression in den Knochen und im Blut gesteigert. Bei den in-vitro-Versuchen sanken die SDF-1-Spiegel durch hohe MMP-9-Spiegel (Georgiou et al. 2012). Dies entspricht den Ergebnissen unserer Studie, mit einem signifikanten SDF-1-Abfall bei den Patienten mit der MTX-Behandlung. Hierzu muss man jedoch auch erwähnen, dass die Patienten bei schon laufender Therapie akquiriert wurden und nicht bei der Erstdiagnose. Somit sind die möglichen Auswirkungen auf das Knochenmark mit daraus resultierender Steigerung der MMP-9 eher möglich aufgrund der langen Therapiedauer. Andererseits zeigten Hansen et al. (2006) konstante bzw. erhöhte CXCL12-Spiegel unter der MTX-Therapie innerhalb von 28 Wochen im Vergleich zu einer gesunden Kohorte.

In dieser Forschungsarbeit kam es zu keinem SDF-1-Abfall nach der anti-TNF α -Therapie, wie bereits in der Literatur beschrieben. Bei Psoriasis-Arthritis ähnlich wie bei den RA-Patienten wurde nach der Behandlung mit Infliximab eine geringere Expression von SDF-1 im Gewebe sowie niedrige Serumspiegel erfasst (Cañete et al. 2004).

Gründe für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse von Ang-1, Ang-2 und SDF-1 könnten zum einen die geringe Fallzahl mit jeweils zehn Patienten pro Medikamentengruppe, zum anderen unterschiedliche RA-Stadien und womöglich weitere Nebenerkrankungen und deren medikamentöse Behandlung sein.

Wir stellten signifikant höhere SDF-1-Serumspiegel bei Patienten, die zusätzlich eine Prednisolon-Therapie erhalten haben im Gegensatz zu denen ohne die Glukokortikoidbehandlung. Caulfield et al. (2002) wiesen eine durch Glukokortikoide bedingte, dosisabhängige Steigerung von SDF-1 sowie CXCR4 in den Monozyten nach. SDF-1 sowie CXCR4 sind unter anderem für eine zelluläre Normalverteilung zuständig. Dies wirkt sich beispielsweise in der Migration der Monozyten vom Ort des entzündlichen Geschehens in nicht befallene extravaskuläre Bereiche aus. Somit führt die gesteigerte CXCR4-Expression, bedingt durch die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide, zu einer negativen Rückkopplung und hindert somit Monozyten an der Migration zum Entzündungsgeschehen.

Keines der antirheumatischen Medikamente hat in unserer Studie zu einer SDF-1-Steigerung geführt. Einerseits fördert SDF-1 die Angiogenese in den Gelenken und einen Abbau der Knorpelmatrix, andererseits können erhöhte Spiegel eine Freisetzung und Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark hervorrufen und somit eine therapeutische Neovaskularisation bei ischämischen Geschehen fördern (Yamaguchi et al. 2003).

4.8 Allgemeines

Eine der Hauptprinzipien der Behandlung der RA ist es mittels einer adäquaten Therapie die Gelenkdestruktion zu bremsen und extraartikuläre Erscheinungsformen mit darauffolgenden Komplikationen wie beispielsweise Atherosklerose zu verhindern. Womöglich könnte man einen neuen Ansatz in der Therapie durch Hemmung der pathologischen Angiogenese über die Unterdrückung der Gefäßwachstumsfaktoren bzw. Chemokine finden. Jedoch zeigte keines, der in dieser Studie untersuchten antirheumatischen Mittel, eine direkte Wirkung auf die angiogenesefördernden Stimulatoren.

Wir konnten Zusammenhänge zwischen den DMARD und deren Auswirkung auf die Lipidspiegel, sowie eine Korrelation zwischen dem Stadium der Krankheitsaktivität bzw. der Wahrscheinlichkeit in den nächsten zehn Jahren ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, und der begleitenden Therapie nachweisen.

Einer der bedeutendsten Ergebnisse war der Anstieg der Endothelvorläuferzellen unter Tocilizumab in den sechs Monaten der Behandlung. Obwohl es keine Veränderung bei der Messung der Gefäßsteifigkeit gab, da feine Veränderungen im Gefäßstatus kaum zu erfassen sind, kann man die höheren EPC-Zahlen als ein Zeichen für die Regeneration der geschädigten Gefäße betrachten. Es bedarf weiterer Forschungsarbeiten, um den Stimulus für die Mobilisation von EPCs bei der Tocilizumab-Therapie endgültig zu verstehen und eine adäquate Therapie zur Vorbeugung der Atherosklerose zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Entzündlich-rheumatische Systemerkrankungen sind durch ein, dem Diabetes mellitus vergleichbar, signifikant erhöhtes kardiovaskuläres Risiko gekennzeichnet. Der Risikozuwachs resultiert einerseits aus proatherogenen Effekten des chronischen Inflammationsprozesses per se, andererseits aus den kardiovaskulären Effekten der Therapie. Zudem manifestieren sich die Krankheitsbilder mitunter spezifisch an den Gefäßen.

Die Rheumatoide Arthritis ist eine Erkrankung mit einem hohen Risiko für eine extraartikuläre Manifestation in Form von kardiovaskulären Befall. Unter anderem liegt es am gemeinsamen immunologischen und entzündlichen Mechanismus, der sowohl der RA als auch der Atherosklerose zugrunde liegt. Unter einer großen Anzahl an Zytokinen fällt die Schlüsselrolle in der Entwicklung der autoimmun-entzündlichen Erkrankung sowie deren kardiovaskulären Folgen unter anderem dem IL-6 zu. IL-6 war Gegenstand vieler Studien, die eine negative Auswirkung hoher IL-6-Spiegel auf die Progression der Atherosklerose nachgewiesen haben. Mittels Statine, durch deren pleiotrope Wirkung, unter anderem auch die Senkung der IL-6-Spiegel im Serum, kann die Entstehung der Atherosklerose verhindert oder zumindest verlangsamt werden. Hierbei bleibt die antiatherogene Wirkung durch den lipidsenkenden Effekt der Statine bei der RA. Die Behandlung mit Tocilizumab hemmt den IL-6-Signalweg. Es ist zwar als Nebenwirkung bekannt, dass die Lipidspiegel unter der Tocilizumab-Therapie ansteigen, jedoch ist es auch nachgewiesen, dass eine parallelzeitig begonnene Statinbehandlung einen positiven Einfluss auf die Lipidwerte aufweist.

Besonderes Augenmerk ist bei den RA-Patienten auf ein richtiges Management der kardiovaskulären Risikofaktoren zu richten. So sollte bei einer zielorientierten Therapie die Glukokortikoiddosis soweit wie möglich reduziert werden und besondere Vorsicht bei den, das kardiovaskuläre Risiko begünstigenden Medikamenten geboten werden. Eine regelmäßige Neuerfassung des Framingham Scores entsprechend den aktuellen Empfehlungen der EULAR sollte unter Berücksichtigung des persönlichen Risikos erfolgen. Erreichen von Blutdruckwerten unterhalb von 140/90 mmHg und ein normwertiger Lipidstatus sind erstrebenswert. Außerdem ist es bei der Begleitung von RA-Patienten wichtig diese für eine gesunde Lebensführung zu sensibilisieren: kein Nikotinabusus, ausreichend Bewegung.

Dank neuer medizinischer Erkenntnisse und einem breiten Spektrum an Medikamenten bei der Behandlung der RA eröffnen sich fortwährend weitere Möglichkeiten die Morbiditätsrate der extraartikulären Manifestation sowie die daraus resultierende Mortalitätsrate zu senken. Aufgrund einer enormen Komplexität der Pathogenese der RA sind weitere Forschungen unabdingbar, um die bestmögliche Therapie gewährleisten zu können.

6 Literaturverzeichnis

Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJ, Kvien TK, Dougados M, Radner H, Atzeni F et al. (2017): EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis* 76, 17-28

Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K et al. (2003): Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9, 1370–1376

Akhavani MA, Madden L, Buyschaert I, Sivakumar B, Kang N, Paleolog EM (2009): Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11, R64

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62, 2569–2581

Angelo LS, Kurzrock R (2007): Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship to Inflammatory Mediators. *Clin Cancer Res* 13, 2825–2830

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, 964–966

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Silver M, Isner JM (1999): VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO* 18, 3964–3972

Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D (2008): Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 59, 1690–1697

Avouac J, Allanore Y (2008): Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: effects of anti-TNF drugs. *Expert Opin Pharmacother* 9, 1121–1128

Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D (2005): Stimulation of Endothelial Progenitor Cells: A New Putative Therapeutic Effect of Angiotensin II Receptor Antagonists. *Hypertension* 45, 526–529

- Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marmé D, Feldmann M, Maini RN, Paleolog EM (2001): Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 2055–2064
- Bartok B, Firestein GS (2010): Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233, 233–255
- Boers M, Nurmohamed MT, Doelman CJ, Lard LR, Verhoeven AC, Voskuyl AE, Huizinga TW, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, van der Linden S (2003): Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62, 842–845
- Brennan FM, McInnes IB (2008): Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118, 3537–3545
- Brozik M, Rosztóczy I, Merétey K, Bálint G, Gaál M, Balogh Z, Bart M, Mítuszova M, Velics V, Falus A (1992): Interleukin 6 levels in synovial fluids of patients with different arthritides: correlation with local IgM rheumatoid factor and systemic acute phase protein production. *J Rheumatol* 19, 63–68
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE (2006): Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 11, 529–543
- Cañete JD, Pablos JL, Sanmartí R, Mallofré C, Marsal S, Maymó J, Gratacós J, Mezquita J, Mezquita C, Cid MC (2004): Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor α therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 1636–1641
- Caulfield J, Fernandez M, Snetkov V, Lee T, Hawrylowicz C (2002): CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. *Immunology* 105, 155–162
- Cho SK, Kim D, Won S, Lee J, Park B, Jang EJ, Bae SC, Sung YK (2018): Impact of anti-rheumatic treatment on cardiovascular risk in Asian patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 47, 501–506
- Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F (2002): Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet* 359, 1173–1177
- Choy EH, Panayi GS (2001): Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 344, 907–916
- Choy E, Sattar N (2009): Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions. *Ann Rheum Dis* 68, 460–469

- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R (2010): Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Maedica (Buchar)* 5, 286-291
- Cutolo M, Seriola B, Villaggio B, Pizzorni C, Craviotto C, Sulli A (2002): Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966, 131–142
- Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JPT, Lennon L, Eiriksdottir G et al. (2008): Long-Term Interleukin-6 Levels and Subsequent Risk of Coronary Heart Disease: Two New Prospective Studies and a Systematic Review. *PLoS Med* 5, e78
- Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G (1992): Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19, 22–25
- David S, Kümpers P, Lukasz A, Kielstein JT, Haller H, Fliser D (2009): Circulating angiopoietin-2 in essential hypertension: relation to atherosclerosis, vascular inflammation, and treatment with olmesartan/pravastatin. *J Hypertens* 27, 1641–1647
- Del Porto F, Lagana B, Lai S, Nofroni I, Tinti F, Vitale M, Podestà E, Mitterhofer AP, D'Amelio R (2007): Response to anti-tumour necrosis factor alpha blockade is associated with reduction of carotid intima-media thickness in patients with active rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 46, 1111–1115
- Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, Chio MD, Lechi A (2007): Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 25, 127–132
- Dessein PH, Joffe BI (2006): Insulin resistance and impaired beta cell function in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 2765–2775
- Dubikov AI, Kalinichenko SG (2010): Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 39, 368–372
- Eklund L, Saharinen P (2013): Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp Cell Res* 319, 1271–1280
- Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY (2007): Interleukin-6 Stimulates Circulating Blood-Derived Endothelial Progenitor Cell Angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 90–98
- Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM (1999): Pathways of Macromolecular Extravasation Across Microvascular Endothelium in Response to VPF/VEGF and Other Vasoactive Mediators. *Microcirculation* 6, 23–44
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669–676

- Fiedler U, Augustin HG (2006): Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 27, 552–558
- Firestein GS (1996): Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39, 1781–1790
- Folkman J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27–31
- Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, Bruce B (2002): HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 46, 2320–2329
- Fukuda Y, Ishida N, Noguchi T, Kappas A, Sassa S (1992): Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 960–965
- Georgiou KR, Scherer MA, King TJ, Foster BK, Xian CJ (2012): Deregulation of the CXCL12/CXCR4 axis in methotrexate chemotherapy-induced damage and recovery of the bone marrow microenvironment. *Int J Exp Pathol* 93, 104–114
- Ghosh R, Alajbegovic A, Gomes AV (2015): NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 536962
- Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, Greenland P, Lackland DT, Levy D, O'Donnell CJ et al. (2014): 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 129, 49-73
- Goldstein JL, Brown MS (1977): Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 26, 1257-1275
- Goodson NJ, Silman AJ, Pattison DJ, Lunt M, Bunn D, Luben R, Day N, Khaw KT, Symmons DP (2004): Traditional cardiovascular risk factors measured prior to the onset of inflammatory polyarthritis. *Rheumatology* 43, 731-736
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987): The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30, 1205-1213
- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, Weigel G, Schwarzingler I, Wolozczuk W, Steiner G et al. (2005): Depletion of Endothelial Progenitor Cells in the Peripheral Blood of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Circulation* 111, 204–211

- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Saemann M, Schwarzingler I, Buranyi B, Steiner G, Smolen JS (2007): Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: effects of tumour necrosis factor and glucocorticoid therapy. *Ann Rheum Dis* 66, 1284–1288
- Guo AM, Arbab AS, Falck JR, Chen P, Edwards PA, Roman RJ, Scicli AG (2007): Activation of Vascular Endothelial Growth Factor through Reactive Oxygen Species Mediates 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-Induced Endothelial Cell Proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 18–27
- Guo AM, Scicli G, Sheng J, Falck JC, Edwards PA, Scicli AG (2009): 20-HETE can act as a nonhypoxic regulator of HIF-1 in human microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H602-613
- Guo AM, Janic B, Sheng J, Falck JR, Roman RJ, Edwards PA, Arbab AS, Scicli AG (2011): The Cytochrome P450 4A/F-20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid System: A Regulator of Endothelial Precursor Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood. *J Pharmacol Exp Ther* 338, 421–429
- Hansen IB, Ellingsen T, Hornung N, Poulsen JH, Lottenburger T, Stengaard-Pedersen K (2006): Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol* 33, 1754–1759
- Harada M, Mitsuyama K, Yoshida H, Sakisaka S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Ariyoshi M, Saiki T, Sakamoto M, Nagata K et al. (1998): Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 27, 377-380
- Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K (2009): Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 60, 661–668
- 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
- Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2011): The Synovium in Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol J* 5, 107-114
- Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Béchir M, Spieker LE, Neidhart M, Michel BA et al. (2002): Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha Treatment Improves Endothelial Function in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Circulation* 106, 2184–2187
- Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008): Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J* 275, 4448–4455
- Jodon de Villeroché V, Avouac J, Ponceau A, Ruiz B, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y (2010): Enhanced late-outgrowth circulating endothelial progenitor cell levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 12, R27

- 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 U S A* 97, 3422–3427
- Kanik KS, Hagiwara E, Yarboro CH, Schumacher HR, Wilder RL, Klinman DM (1998): Distinct patterns of cytokine secretion characterize new onset synovitis versus chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25, 16–22
- Kavanaugh A, Wells AF (2014): Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 53, 1742-1751
- Kawashiri S, Kawakami A, Yamasaki S, Imazato T, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Nakamura H, Ida H et al. (2011): Effects of the anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 31, 451–456
- Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y (2012): Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51, 1571–1579
- Kim H, Kim M, Lee C, Hong Y (2015): Effects of Methotrexate on Carotid Intima-media Thickness in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Korean Med Sci* 30, 1589
- Koch AE (2000): The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments. *Ann Rheum Dis* 59, 65-71
- Krüger K, Wollenhaupt J, Albrecht K, Alten R, Backhaus M, Baerwald C, Bolten W, Braun J, Burkhardt H, Burmester G et al. (2012): S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012. *Z Rheumatol* 71, 592–603
- Kulkarni HS, Kasi PM (2012): Rituximab and Cytokine Release Syndrome. *Case Rep Oncol* 5, 134–140
- Lapidot T, Kollet O (2002): The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. *Leukemia* 16, 1992–2003
- Lee C, Lee EY, Chung SM, Mun SH, Yoo B, Moon H (2004): Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor kappaB, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Arthritis Rheum* 50, 3831–3843
- Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY (2001): Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 19, 321–324

- Lopez-Mejias R, Corrales A, Genre F, Hernandez JL, Ochoa R, Blanco R, González-Juanatey C, Martín J, Llorca J, González-Gay MA (2013): Angiopoietin-2 serum levels correlate with severity, early onset and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 31, 761–766
- Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschläger M, Chen L, Frister A, Schlitt A, Luther T, Song N, Hofmann B et al. (2011): Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med* 15, 994–1004
- Lubberts E, van den Berg WB (2003): Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. *Adv Exp Med Biol* 520, 194-202
- Luis Vitetta L, Coulson S, Schloss J, Beck SL, Allen R, Sali A (2012): Dietary recommendations for patients with rheumatoid arthritis: a review. *Nutr Diet Suppl* 4, 1-15
- Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J (2003): In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949–954
- Mangoni AA, Zinellu A, Sotgia S, Carru C, Piga M, Erre GL (2017): Protective Effects of Methotrexate against Proatherosclerotic Cytokines: A Review of the Evidence. *Mediators Inflamm* 2017, 9632846
- Manzi S, Wasko MC (2000): Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 59, 321–325
- Mathieu S, Pereira B, Dubost J, Lussion J, Soubrier M (2012): No significant change in arterial stiffness in RA after 6 months and 1 year of rituximab treatment. *Rheumatology* 51, 1107–1111
- Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, Gabriel SE (2005a): Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 52, 402–411
- Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE (2005b): Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis Rheum* 52, 722–732
- Mattace-Raso F, Hofman A, Verwoert GC, Wittemana JC, Wilkinson I, Cockcroft J, McEniery C, Laurent S, Boutouyrie P, Bozec E et al. (2010): Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J* 31, 2338–2350
- McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J (1999): Embryonic Expression and Function of the Chemokine SDF-1 and Its Receptor, CXCR4. *Dev Biol* 213, 442–456
- McInnes IB, Schett G (2007): Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7, 429–442

McInnes IB, Schett G (2011): The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 365, 2205-2219

<https://www.mdcalc.com/framingham-risk-score-hard-coronary-heart-disease>

Mittal GA, Joshi VR, Deshpande A (2003): Stromal cell-derived factor-1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 915–916

Montecucco F, Mach F (2009): Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. In: *Rheumatology (Oxford)* 48, 11–22

Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S (2001): Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* 938, 36-47

Müller P, Kazakov A, Jagoda P, Semenov A, Bohm M, Laufs U (2009): ACE inhibition promotes up-regulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res* 83, 106–114

Munneke M, de Jong Z, Zwinderman AH, Ronday HK, van den Ende CH, Vliet Vlieland TP, Hazes JM (2004): High intensity exercise or conventional exercise for patients with rheumatoid arthritis? Outcome expectations of patients, rheumatologists, and physiotherapists. *Ann Rheum Dis* 63, 804–808

Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N (2003): Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1521–1529

Nanki T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y, Miyasaka N (2001): Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. *The J Immunol* 167, 5381–5385

Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J (2009): Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis* 68, 1580–1584

Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM et al. (2007): Meta-analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med* 146, 797-808

Nissen SE, Yeomans ND, Solomon DH, Lüscher TF, Libby P, Husni ME, Graham DY, Borer JS, Wisniewski LM, Wolski KE et al. (2016): Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med* 375, 2519–2529

- Nürnberg J, Keflioglu-Scheiber A, Opazo Saez AM, Wenzel RR, Philipp T, Schäfers RF (2002): Augmentation index is associated with cardiovascular risk. *J Hypertens* 20, 2407-2414
- Ohmura K, Nguyen LT, Locksley RM, Mathis D, Benoist C (2005): Interleukin-4 can be a key positive regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1866-1875
- Oliver JE; Silman AJ (2009): Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 11, 252
- Ollier W (2000): Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy? *Ann Rheum Dis* 59, 497-499
- Panoulas VF, Douglas KMJ, Milionis HJ, Stavropoulos-Kalinglou A, Nightingale P, Kita MD, Tselios AL, Metsios GS, Elisaf MS, Kitas GD (2007): Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 46, 1477-1482
- Papagoras C, Voulgari PV, Drosos AA (2009): Long-term use of adalimumab in the treatment of rheumatic diseases. *Open Access Rheumatol* 1, 51-68
- Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, Maffei S, Pompella G, Auteri A, Puccetti L (2006): Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med* 6, 38-44
- Patel AM, Moreland LW (2010): Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: a review of tocilizumab therapy. *Drug Des Devel Ther* 4, 263-278
- Patel JV, Lim HS, Varughese GI, Hughes EA, Lip GY (2009): Angiotensin-2 levels as a biomarker of cardiovascular risk in patients with hypertension. *Ann Med* 40, 215-222
- Patschan S, Nemirovsky K, Henze E, Scholze J, Müller GA, Patschan D (2014): Tocilizumab increases EPC regeneration in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 43, 528-530
- Pepine CJ, Gurbel PA (2017): Cardiovascular safety of NSAIDs: Additional insights after PRECISION and point of view. *Clin Cardiol* 40, 1352-1356
- Pereira T, Correia C, Cardoso J (2015): Novel Methods for Pulse Wave Velocity Measurement. *J Med Biol Eng* 35, 555-565
- Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, McInnes IB, Haentzschel H, Gonzalez-Gay MA, Provan S et al. (2010): EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 69, 325-331
- Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF et al. (2005): Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 296-301

- Pruijn GJM, Wiik A, van Venrooij WJ (2010): The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12, 203
- Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ (2003): Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2741–2749
- Raterman HG, Levels H, Voskuyl AE, Lems WF, Dijkmans BA, Nurmohamed MT (2013): HDL protein composition alters from proatherogenic into less atherogenic and proinflammatory in rheumatoid arthritis patients responding to rituximab. *Ann Rheum Dis* 72, 560–565
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003): Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation* 107, 1164–1169
- Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, Fernandez P, Cronstein BN, Chan ES (2008): Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum* 58, 3675–3683
- Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, Lafferty EI, Cook DJ, Fox-Robichaud A et al. (2011): Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 39, 702–710
- Ross R (1999): Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340, 115–126
- Ross R, Glomset JA (1976): The Pathogenesis of Atherosclerosis. *N Engl J Med* 295, 369–377
- Roudier J (2006): HLA-DRB1 genes and extraarticular rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, 103
- Sanmartí R, Gómez-Centeno A, Ercilla G, Larrosa M, Viñas O, Vazquez I, Gómez-Puerta JA, Gratacós J, Salvador G, Cañete JD (2007): Prognostic factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a two year prospective study after a structured therapeutic strategy using DMARDs and very low doses of glucocorticoids. *Clin Rheumatol* 26, 1111–1118
- Saraux A, Berthelot JM, Gérard Chales, Le Henaff C, Mary JY, Thorel JB, Hoang S, Dueymes M, Allain J, Devauchelle V et al. (2002): Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 47, 155–165
- Schiff MH, Kremer JM, Jahreis A, Vernon E, Isaacs JD, van Vollenhoven RF (2011): Integrated safety in tocilizumab clinical trials. *Arthritis Res Ther* 13, R141
- Scott BB, Zaratini PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR (2002): Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 29, 230–239

- Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, Kano S, Shimada K (1994): Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 6, 87–91
- Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, Jover R (2000): Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* 32, 49–55
- Smith MD, Walker JG (2004): Apoptosis a relevant therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 43, 405–407
- Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R et al. (2007): The Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells After Acute Ischemic Stroke Is Associated With Good Outcome. *Stroke* 38, 2759–2764
- Sokka T, Pincus T (2009): Erythrocyte Sedimentation Rate, C-Reactive Protein, or Rheumatoid Factor Are Normal at Presentation in 35 % – 45 % of Patients with Rheumatoid Arthritis Seen Between 1980 and 2004: Analyses from Finland and the United States. *J Rheumatol* 36, 1387–1390
- Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC (2003): Cardiovascular Morbidity and Mortality in Women Diagnosed With Rheumatoid Arthritis. *Circulation* 107, 1303–1307
- Souverein PC, Berard A, Van Staa TP, Cooper C, Egberts AC, Leufkens HG, Walker BR (2004): Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart* 90, 859–865
- Steinbrocker O, Traeger CH, Battermann RC (1949): Therapeutic Criteria in Rheumatoid Arthritis. *J Am Med Assoc* 140, 659–662
- Strang AC, Bissoendial RJ, Kootte RS, Schulte DM, Dallinga-Thie GM, Levels JH, Kok M, Vos K, Tas SW, Tietge UJ et al. (2013): Pro-atherogenic lipid changes and decreased hepatic LDL receptor expression by tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 229, 174–181
- Stroncek JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA, Reichert WM (2009): Comparison of Endothelial Cell Phenotypic Markers of Late-Outgrowth Endothelial Progenitor Cells Isolated from Patients with Coronary Artery Disease and Healthy Volunteers. *Tissue Eng Part A* 15, 3473–3486
- Svensson B, Boonen A, Albertsson K, van der Heijde D, Keller C, Hafström I (2005): Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: A two-year randomized trial. *Arthritis Rheum* 52, 3360–3370

Swerdlow DI, Holmes MV, Kuchenbaecker KB, Engmann JE, Shah T, Sofat R, Guo Y, Chung C, Peasey A, Pfister R et al. (2012): The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet* 379, 1214-1224

Symmons DP (2002): Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16, 707–722

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S (2003a): New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I. *Circulation* 108, 1917–1923

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S (2003b): Biomarkers of Vascular Disease Linking Inflammation to Endothelial Activation: Part II. *Circulation* 108, 2041–2048

Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Shimokawa H, Egashira K, Takeshita A (2001): Thrombin Induces Interleukin-6 Expression Through the cAMP Response Element in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1759–1763

Tuscano JM, Sands J (2009): B cell reductive therapy with rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics* 3, 225–232

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

van Halm VP, Nielen MMJ, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, Twisk JW, van de Stadt RJ, de Koning MH, Habibuw MR et al. (2006a): Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66, 184–188

van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JWR, Dijkmans BAC, Voskuyl AE (2006b): Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther* 8, R151

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, E1-7

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

Werner N, Kosiol, 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

Westlake SL; Colebatch AN; Baird J; Kiely P; Quinn M; Choy E, Ostor AJ, Edwards CJ (2010): The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* 49, 295–307

Westra J, de Groot L, Plaxton SL, Brouwer E, Posthumus MD, Kallenberg CGM, Bijl M (2011): Angiopoietin-2 is highly correlated with inflammation and disease activity in recent-onset rheumatoid arthritis and could be predictive for cardiovascular disease. *Rheumatology (Oxford)* 50, 665–673

Whittle SL, Hughes RA (2003): Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology (Oxford)* 43, 267–271

Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM (1998): Chemotactic Properties of Angiopoietin-1 and -2, Ligands for the Endothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie2. *J Biol Chem* 273, 18514–18521

Wolfe F, Michaud K (2007): The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy on the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis in 19,562 patients during 89,710 PERSON-YEARS of observation. *Arthritis Rheum* 56, 1433–1439

Wolf AS, Gnudi L, Long DA (2009): Roles of Angiopoietins in Kidney Development and Disease. *J Am Soc Nephrol* 20, 239–244

Yamaguchi JI, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM et al. (2003): Stromal cell-derived factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation* 107, 1322–1328

Yelamos J, Raúl Garcia-Lozano J, Moreno I, Aguilera I, Francisca Gonzalez M, Garcia A, Nuñez-Roldan A, Sanchez B (1993): Association of hla-dr4-dw15 (drb1*0405) and dr10 with rheumatoid arthritis in a spanish population. *Arthritis Rheum* 36, 811–814

Yoo SA, Kwok SK, Kim WU (2008): Proinflammatory Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Prospects for Therapeutic Intervention. *Mediators Inflamm* 2008, 129873

Yoon C, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH et al. (2005): Synergistic Neovascularization by Mixed Transplantation of Early Endothelial Progenitor Cells and Late Outgrowth Endothelial Cells: The Role of Angiogenic Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *Circulation* 112, 1618–1627

Zhang K; Huang X; Li X; Feng M; Li L; Cai X, Zhang C, Liu XL, Zhang MX, Zhang Y et al. (2012): Interleukin 6 destabilizes atherosclerotic plaques by downregulating prolyl-4-hydroxylase α 1 via a mitogen-activated protein kinase and c-Jun pathway. *Arch Biochem Biophys* 528, 127–133

Zink A, List SM, Minden K (2010): Entzündlich-rheumatische Erkrankungen. (Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Robert Koch-Institut, Berlin 2010