

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. C. Kessler  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Die Assoziation zwischen dem Angiotensin-Converting-Enzym  
(ACE)–Genpolymorphismus und subklinischer Atherosklerose**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)  
der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität  
Greifswald

Vorgelegt von: Anke Barnasch  
geboren am: 29.07.1976  
in: Greifswald

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

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Schminke

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Berger

Ort, Raum: Konferenzraum der Klinik für Neurologie und Neurochirurgie

Tag der Disputation: 12.10.2009

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Renin-Angiotensin-System	2
1.1.1. ACE – Angiotensin-Converting-Enzym	2
1.1.2. AT II – Angiotensin II	3
1.1.3. Das lokale Renin-Angiotensin-System	3
1.2. Der Polymorphismus des ACE-Gens	5
1.3. Der ACE-Polymorphismus und das Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall	6
1.4. Die Intima-Media-Dicke als Surrogatparameter für Atherosklerose	11
1.5. Der ACE-Polymorphismus und subklinische Atherosklerose	13
1.6. Fragestellung	16
<b>2. Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Die SHIP-Studie	17
2.2. Datenerhebung	18
2.3. Ultraschalluntersuchungen der Arteria carotis	19
2.3.1. Die Intima-Media-Dicke im Ultraschallbild	19
2.3.2. Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis	20
2.3.3. Bestimmung von atherosklerotischen Plaque der Arteria carotis	22
2.3.4. Bestimmung von Stenosen der Arteria carotis	23
2.4. Genetische Analyse	24
2.5. Statistische Methoden	25

<b>3. Ergebnisse</b>	26
3.1. Risikofaktoren für kardiovaskuläre bzw. zerebrovaskuläre Erkrankungen	26
3.2. Prävalenz vaskulärer Erkrankungen	27
3.3. Häufigkeiten der ACE-Genotypen in der Gesamtstichprobe	28
3.4. Vergleich der Häufigkeit von vaskulären Erkrankungen in der Anamnese in Abhängigkeit des ACE-Genotyps	30
3.5. Atherosklerotische Gefäßwandläsionen	31
3.6. Vergleich der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis bei Probanden mit dem II- und DD-Genotyp	32
3.7. Vergleich der Häufigkeiten von atherosklerotischen Plaques in der Arteria carotis bei Teilnehmern mit homozygotem II- und DD-Genotyp	35
3.8. Subgruppenanalyse	37
3.9. Multivariante logistische Regressionsanalyse	38
<b>4. Diskussion</b>	39
<b>5. Zusammenfassung</b>	48
<b>6. Thesen</b>	51
<b>7. Literatur</b>	55
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	80
<b>9. Eidesstattliche Erklärung</b>	82
<b>10. Lebenslauf</b>	83
<b>11. Danksagung</b>	85

## 1. Einleitung

Vaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall stellen die häufigsten Todesursachen in Deutschland und in den übrigen industrialisierten Ländern dar (Abbildung 1). Der Schlaganfall ist zudem die häufigste Ursache für körperliche Behinderung und für den Verlust der psychosozialen Interaktionsfähigkeit (ANGELERI et al. 1993). Die Atherosklerose ist dabei in den meisten Fällen dieser beiden Erkrankungen das zugrunde liegende pathogenetische Korrelat. Zu den wichtigsten Risikofaktoren der Atherosklerose gehören Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Nikotinabusus (KANDEL et al. 1986, WATTANAKI et al. 2005). Da das Ausmaß der Atherosklerose bei Vorliegen von Risikofaktoren interindividuell stark variiert (GREENLAND et al. 2000), legt dies die Hypothese nahe, dass genetische Faktoren die Suszeptibilität eines Individuums für atherosklerotische Gefäßerkrankungen beeinflussen. Genetische Faktoren der Atherosklerose sind daher in den vergangenen Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (CASAS et al. 2004, HUMPHRIES et al. 2004).

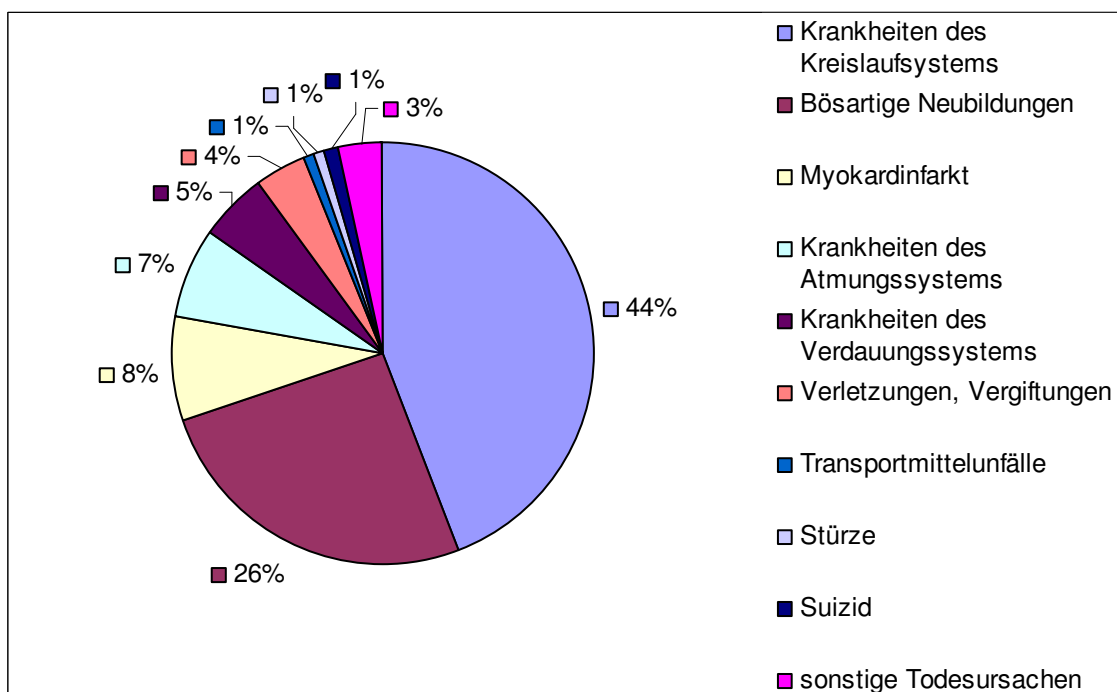


Abbildung 1: Sterbefälle, sortiert nach den 10 häufigsten Todesursachen im Jahr 2005 (Statistisches Bundesamt Deutschland 2005)

## **1.1. Das Renin-Angiotensin-System**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) besitzt eine große Bedeutung bei der Pathogenese der Atherosklerose (BRAUNWALD 1992). Es ist ein mehrfach, insbesondere mit Renin rückgekoppeltes Regulationssystem zur Konstanterhaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, Plasmaosmolarität und Blutdruck. Die biologisch wirksamen Substanzen des Systems sind Angiotensin II und das von ihm aus der Nebenniere freigesetzte Aldosteron. Angiotensin II ist eine stark vasokonstriktorisch wirkende physiologische Substanz und führt an den Nieren über eine Verminderung der renalen Durchblutung zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Zudem ist Angiotensin II das wichtigste Hormon für die Stimulation der Aldosteronsekretion aus der Nebennierenrinde (BALLA et al. 1991, MATSUSAKA et al. 1997).

Aldosteron wirkt über die Erhöhung des zirkulierenden Volumens durch Natrium-Rückresorption und Verminderung der Wasserausscheidung der Abnahme der glomerulären Filtrationsrate entgegen. Eine wichtige Rolle übernimmt das RAS bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes (SKEGGS et al. 1976). Veränderungen des extrazellulären Volumens, der Osmolarität sowie Blut- oder Salzverluste stimulieren das RAS. Daraus resultiert eine Erhöhung des Plasmaspiegels von Angiotensin II (MATSUSAKA et al. 1997). Hemmstoffe des RAS, insbesondere Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer, werden zum Beispiel zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz und zur Therapie bei Hypertonus eingesetzt (THE CONSENSUS TRIAL STUDY GROUP 1987, DÜSING et al. 2003, WONG et al. 2004).

### **1.1.1. ACE – Angiotensin-Converting-Enzym**

Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) nimmt eine wichtige Rolle im RAS ein. Es ist im Endothel der Blutgefäße lokalisiert und vor allem im Pulmonalkreislauf zu finden. Es wurde aber auch in Epithelzellen, in Makrophagen und in einer zirkulierenden Form gefunden (CAMBIEN 1994, MÜLLER et al. 1998). Bei

Aktivierung des RAS wird Angiotensinogen, ein Plasmaprotein, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, durch Renin in Angiotensin I überführt. Hauptbildungsort der Protease Renin sind die juxtaglomerulären Zellen der Niere (UNTERBERG et al. 1998). In einem weiteren Schritt wandelt ACE das inaktive Dekapeptid Angiotensin I durch Abspaltung von zwei Aminosäuren in das vasoaktive und aldosteronstimulierende Oktapeptid Angiotensin II um, welches seine Wirkungen über spezifische Rezeptoren (AT 1 und AT 2) entfaltet (DE GASPARO et al. 2000).

Die Kontrolle der Reninsekretion erfolgt über lokale und systemische Mechanismen, beispielsweise über intrarenale Barorezeptoren in den Gefäßen oder über die distal-tubuläre Natriumkonzentration. Des Weiteren erfolgt eine Stimulation durch Adrenalin sowie eine Suppression durch Angiotensin II (MATSUSAKA et al. 1997).

### **1.1.2. AT II – Angiotensin II**

Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor, der die Proliferation glatter Muskelzellen fördert und zu hypertrophischen Veränderungen der Gefäßwand führt (BERK et al. 1989). Darüber hinaus bewirkt es eine vermehrte Matrixsynthese, verstärkt die Expression von Protoonkogen-mRNA und die Synthese des Wachstumsfaktors PDGF (platelet derived growth factor) (KATO et al. 1991, PATEL et al. 1996).

Angiotensin II hat eine sehr kurze Halbwertszeit. Bei Passage durch die meisten Gewebe wird es durch Endopeptidasen zu Angiotensin III, Angiotensin 1-7 und andere C-terminale Fragmente abgebaut (UNTERBERG et al. 1998).

### **1.1.3. Das lokale Renin-Angiotensin-System**

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass neben dem zirkulierenden RAS auch ein gewebeständiges, lokales RAS existiert (LINDPAINTNER et al. 1990, MÜLLER et al. 1998).

Angiotensin II induziert in glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation von Protoonkogenen (HOLYCROSS et al. 1993) und Adhäsionsmolekülen (TUMMALA et al. 1999).

Es ist an der Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten in der Gefäßwand beteiligt (FARBER et al. 1990) und beschleunigt die Aufnahme von Lipiden sowie deren Oxidation, in deren Folge oxidativer Stress entsteht (KEIDAR et al. 1994). Dieser proinflammatorische Effekt des Angiotensins scheint prädisponierend für Plaquerupturen zu sein (GIBBONS et al. 1997).

Nachgewiesen ist zudem eine Interaktion mit endogenen Wachstumsfaktoren (WEBER et al. 1994). Es kommt zur Proliferation, Migration und Hypertrophie glatter Muskelzellen (STOUFFER et al. 1992). Dabei wird vor allem die charakteristische Hypertrophie der Media und die Zunahme der Wanddicke induziert. Das gewebeständige RAS scheint dabei unabhängig vom Einfluss der systemischen Hämodynamik zu arbeiten (GIBBONS et al. 1997).

Alle diese Veränderungen führen zu einer Matrixexpansion und zur Entwicklung einer interstitiellen Fibrose und begünstigen somit das Entstehen von Atherosklerose in der Gefäßwand.



## 1.2. Der Polymorphismus des ACE-Gens

Das menschliche ACE-Gen ist auf Chromosom 17q23 lokalisiert. Es beinhaltet 26 Exons und kodiert für ein Protein aus 1306 Aminosäuren. Es weist einen Insertions/Deletions (I/D)-Polymorphismus auf. Dieser ist durch die An- bzw. Abwesenheit eines 250 bp-Fragments im Intron 16 des ACE-Gens charakterisiert (SOURBRIER et al. 1988). Der I/D-Polymorphismus im Intron 16 kann kodominant folgende Genotypen bedingen: DD (homozygot, Deletion), ID (heterozygot, Deletion und Insertion) und II (homozygot, Insertion).

Diese Genotypen sind über PCR-Analyse nachweisbar. Für Mitteleuropa wurden folgende Allelsequenzen bestimmt: D-Allel 0,57; I-Allel 0,43 (RIGAT et al. 1992). Bei Europäern besteht ein Frequenzverhältnis der II-, ID- und DD-Genotypen von etwa 1:2:1. Es zeigte sich aber eine höhere Frequenz des D-Allels bei Nigerianern und im Gegensatz dazu eine niedrigere bei Polynesiern und Yanomami Indianern (BARLEY et al. 1994).

Dieser Genpolymorphismus erklärt ca. 40-50% der interindividuellen Variabilität der Aktivität des ACE im Serum (CAMBIEN et al. 1988, RIGAT et al. 1990, TIRET et al. 1992), wobei Träger des DD-Genotyps eine 2fach höhere ACE-Aktivität im Serum aufweisen als Träger des II-Genotyps (RIGAT et al. 1990).

### **1.3. Der ACE-Polymorphismus und das Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall**

Eine Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und dem Auftreten von Herzinfarkten wurde erstmals in der ECTIM (Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde)-Studie nachgewiesen, die in einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie 610 Patienten mit Myokardinfarkten und 733 Kontrollen untersuchte. Der DD-Genotyp war dabei mit einem 1,34fach erhöhten Risiko mit dem Auftreten von Myokardinfarkten assoziiert (CAMBIEN et al. 1992).

In einer Subgruppenanalyse von Personen mit niedrigem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, das heißt Personen mit niedrigem Plasma Apo B, geringem Körpermassenindex und ohne eine Behandlung mit Lipidsenkern (79 Patienten, 189 Kontrollen) war der Einfluss des I/D-Polymorphismus noch prägnanter (Odds-Ratio (OR) 3,2) (CAMBIEN et al. 1992). Diese Assoziationen blieben auch nach Ausschluss der Personen unverändert, die mit einem ACE-Hemmer behandelt wurden (CAMBIEN et al. 1994). Einen Zusammenhang des ACE-Polymorphismus mit Herzinfarkten in einer Subgruppenanalyse von Personen mit geringem Körpermassenindex und geringem Zigarettenkonsum beschrieben auch GARDEMANN et al. (1995), wobei in der Gesamtstichprobe kein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse der Physicians' Health Study an 1250 männlichen Patienten mit koronarer Herzkrankheit und 2340 Kontrollen weder in der Gesamtpopulation noch in einer Subgruppenanalyse von Patienten mit niedrigem kardiovaskulären Risiko einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und koronarer Herzerkrankung (LINDPAINTNER et al. 1995). Auch die Copenhagen City Heart Study wies keinen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und koronarer Herzerkrankung nach und zwar unabhängig davon, ob die gesamte Population oder Individuen mit niedrigem kardiovaskulären Risiko untersucht wurden. Grundlage war eine Studie an 699 Männern und 248 Frauen mit koronarer Herzerkrankung und insgesamt 9203 Kontrollen (AGERHOLM-LARSEN et al. 1997a).

Ein Vergleich der Studien von CAMBIEN et al., GARDEMANN et al. und LINDPAINNER et al. zeigt einen weiten Überlappungsbereich der 95%-Konfidenzintervalle in den einzelnen Subgruppen. Die tatsächliche Odds Ratio für Herzinfarkte in Abhängigkeit vom ACE-I/D-Genpolymorphismus liegt wahrscheinlich innerhalb dieses Überlappungsbereiches der Konfidenzintervalle. Nachfolgende bevölkerungsbezogene Studien und Fall-Kontroll-Studien berichteten ebenso sowohl positive als auch negative Resultate. Die Caerphilly Heart Study (MATTU et al. 1995) fand in einer bevölkerungsbezogenen Studie an 1226 Probanden eine positive Assoziation des DD-Genotyps mit koronarer Herzerkrankung bei Männern mit sonst geringem vaskulärem Risikoprofil. Eine positive Assoziation des DD-Genotyps wurde auch in Fall-Kontroll-Studien an Patienten mit fortgeschrittener ischämischer Kardiomyopathie (RAYNOLDS et al. 1993), fatalen Myokardinfarkten (EVANS et al. 1994), ischämischen Herzerkrankungen (NAKAI et al. 1994, KAMITAMI et al. 1995), Myokardinfarkten (LEATHAM et al. 1994, LUDWIG et al. 1995) sowie an Patienten, die sich einer perkutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) unterzogen (BEOHAR et al. 1995, BOCKXMEER et al. 1995), festgestellt. Dem stehen Fall-Kontroll-Studien mit negativen Ergebnissen sowohl an Patienten mit Myokardinfarkten (BOHN et al. 1993, MIETTINEN et al. 1994, SAMANI et al. 1996), als auch an Patienten mit koronarer Herzerkrankung (FRIEDL et al. 1995, KATSUYA et al. 1995, WINKELMANN et al. 1996, ARCA et al. 1998) gegenüber. Selbst Studien, die eine positive Assoziation bei Patienten mit Myokardinfarkt festgestellt hatten, berichteten keinen Zusammenhang des DD-Genotyps bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (LEATHAM et al. 1994, LUDWIG et al. 1995).

Letztlich sind die meisten dieser Fall-Kontroll-Studien durch ihre geringe Fallzahl in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Eine Meta-Analyse von 15 Studien mit insgesamt 3394 Patienten mit Myokardinfarkten und 5479 Kontrollen, in der außer der erst später publizierten Copenhagen City Heart Study (AGERHOLM-LARSEN et al. 1997a) die meisten der oben genannten Studien eingingen, bestätigte eine, wenn auch schwache Assoziation zwischen dem ACE-

Polymorphismus und Herzinfarkt, wobei homozygote Träger des D-Allels ein 1,26fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von Myokardinfarkten aufwiesen (SAMANI et al. 1996). Da allerdings viele Studien mit geringer Fallzahl in diese Meta-Analyse eingingen, könnten die Ergebnisse durch eine so genannte Publication Bias beeinflusst sein, also einer bevorzugten Publikation von Studien mit positiven Ergebnissen, während kleine Studien mit negativen Ergebnissen häufig nicht publiziert werden. Durch den als eher schwach einzuschätzenden Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus ist es durchaus plausibel, dass Studien mit geringer Fallzahl uneinheitliche Resultate hervorrufen. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine neuere Meta-Analyse, die die beiden größten bisher durchgeführten Studien, die Physicians' Health Study (LINDPAINTNER et al. 1995) und die Copenhagen City Heart Study (AGERHOLM-LARSEN et al. 1997a) mit einbezieht und die Daten getrennt nach Studien mit großer und kleiner Studienpopulation analysiert (AGERHOLM-LARSEN et al. 2000). Sowohl bezüglich der Assoziation mit Myokardinfarkten als auch bezüglich der Assoziation mit koronarer Herzkrankung war ein signifikanter Zusammenhang nur bei Studien mit kleiner Studienpopulation (OR 1,47 (95%-KI: 1,30–1,66) bzw. OR 1,29 (95%-KI: 1,15–1,43)), nicht aber bei Studien mit größerer Studienpopulation (OR 0,99 (95%-KI: 0,88–1,12) bzw. OR 1,07 (95%-KI: 0,97–1,17)) nachzuweisen.

Ferner scheinen ethnische Faktoren die Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und ischämischen koronaren Ereignissen zu beeinflussen (JOHANNING et al. 1995). Studien, die an einer asiatischen Bevölkerung durchgeführt wurden, zeigten positive Ergebnisse (NAKAI et al. 1994, KAMITAMI et al. 1995). Hingegen konnten bei afro-amerikanischen Patienten keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden (BLOEM et al. 1996).

Eine Assoziation zwischen dem DD-Genotyp und prävalenten Myokardinfarkten scheint insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus vorzuliegen. Insgesamt vier Fall-Kontroll-Studien an Patienten mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus (RUIZ et al. 1994, FUJISAWA et al. 1995, KEAVNEY et al. 1995, TARNOW et al. 1995)

zeigten eine positive Assoziation mit Odds Ratios zwischen 1,63 und 9,0; die somit deutlich höher liegen als die Odds Ratios der oben genannten Meta-Analyse.

Ähnlich uneinheitliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt fanden sich auch bei den Untersuchungen zu ischämischen Schlaganfällen. Eine statistisch signifikante positive Assoziation des homozygoten DD-Genotyps mit ischämischen Schlaganfällen wurde in einer italienischen Fall-Kontroll-Studie an 215 Patienten und 101 Kontrollen mit einer Odds Ratio von 1,76 (95%-KI: 1,02–3,05) beschrieben (MARGAGLIONE et al. 1996). Eine japanische Studie konnte indes eine signifikante Assoziation nur bei hypertensiven Schlaganfall-Patienten (KARIO et al. 1996) nachweisen. Eine schwedische Studie an 130 Schlaganfall-Patienten und der gleichen Anzahl an nach Geschlecht und Alter gleichen Kontrollen (so genannte matched pair Analyse) zeigte eine signifikante Assoziation des DD-Genotyps mit ischämischen Schlaganfällen für die Subgruppe von Patienten mit einer mehr als 50%igen Carotisstenose mit einer Odds Ratio von 2,23 (95%-KI: 1,08–4,63;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu gesunden Kontrollen und mit einer Odds Ratio von 2,15 (95%-KI: 1,00–4,60;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu Schlaganfall-Patienten ohne Carotisstenose (KOSTULAS et al. 1999). Über eine positive Assoziation des DD-Genotyps mit Schlaganfällen berichteten auch MARKUS et al. (1995), wobei die positive Assoziation nach Adjustierung für traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren überwiegend durch die Subgruppe von lakunären Schlaganfällen determiniert war (OR 4,4; 95%-KI: 1,45–12,6;  $p < 0,01$ ). Eine Assoziation mit durch Atherosklerose der großen Arterien bedingten Schlaganfällen fand sich im Gegensatz zur oben genannten schwedischen Studie nicht. Allerdings hatten nur 18 Patienten einen lakunären Schlaganfall, so dass die Aussagekraft dieser Studie limitiert ist. Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen zerebralen Mikroangiopathien und dem DD-Genotyp allein, vor allem aber in Kombination mit MTHFR 677T und APOE 4 wurde auch von einer ungarischen Studie berichtet, die daraus schlussfolgert, dass mehrere ungünstige Mutationen, die

für sich allein noch keinen signifikanten Zusammenhang ausüben, bei kombiniertem Vorliegen aber durchaus einen bestimmten Phänotypen erklären können (SZOLNOKI et al. 2002). Eine größere Studie an 299 Patienten und 600 Kontrollen sowie eine Meta-Analyse aller Studien, die Patienten mit zerebralen Mikroangiopathien bzw. mit Leukaraiosis eingeschlossen haben, konnte hingegen keine Assoziation mit dem DD-Genotyp reproduzieren (GORMLEY et al. 2007). Eine britische Studie an 418 Schlaganfall-Patienten und 231 Kontrollen fand eine signifikant niedrigere Aktivität des ACE-Enzyms im Plasma von Schlaganfall-Patienten in der Akutphase der Erkrankung, aber keine signifikante Assoziation mit dem ACE I/D Genpolymorphismus (CATTO et al. 1996). Einschränkend ist hier allerdings anzumerken, dass sich die Verteilung der Genotypen bei den Patienten nicht im Hardy-Weinberg-Äquilibrium (CHRISTENSEN 2004) befand, so dass ein Selektions-Bias die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Auch weitere Fall-Kontroll-Studien mit größeren Fallzahlen (UEDA et al. 1995, PHOHL et al. 1998, Pera et al. 2006) inklusive der Copenhagen City Heart Study (AGERHOLM-LARSEN et al. 1997b) und der prospektiven Physicians' Health Study (ZEE et al. 1999) konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und ischämischen Schlaganfällen feststellen. Zwei Meta-Analysen von fünf Studien mit insgesamt 1196 Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und 722 Kontrollen bzw. elf Studien mit 2990 Patienten und 11305 Kontrollen jeweils kaukasischer Herkunft bestätigten eine schwache Assoziation zwischen dem D-Allel und ischämischen Schlaganfällen: OR von 1,31 (95%-KI: 1,06–1,62;  $p = 0,01$ ) bzw. 1,21 (95%-KI: 1,08–1,35;  $p < 0,001$ ) für das rezessive Model (DD versus ID/II) bzw. von 1,14 (95%-KI: 0,91–1,44;  $p = 0,26$ ; nicht signifikant) für das dominante Model (DD/ID versus II) (SHARMA et al. 1998, CASAS et al. 2004). Eine weitere Meta-Analyse von Studien aus Ost-Asien zeigte ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen dem ACE-Polymorphismus und ischämischen Schlaganfällen für chinesische und japanische Bevölkerungsgruppen (OR 1,82; 95%-KI: 1,28–2,60 für das dominante Modell;  $p = 0,0009$ ; ARIYARATNAM et al. 2007).

## **1.4. Die Intima-Media-Dicke als Surrogatparameter für Atherosklerose**

Bisher untersuchten die erwähnten bevölkerungsbasierten epidemiologischen Studien allesamt lediglich Assoziationen mit klinischen Endpunkten wie Mortalität oder Morbidität, d. h. dem Auftreten oder Ausbleiben klinischer Ereignisse wie Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit oder Hirninfarkt, die zudem nur bei relativ wenigen Individuen der untersuchten Bevölkerungsstichprobe auftraten. Neuere epidemiologische Studien verwenden hingegen häufig Surrogatparameter wie die Intima-Media-Dicke (Intima-Media-Thickness, IMT) der A. carotis. Sie ersetzen die klinischen Studien-Endpunkte. Sie können bei jedem Individuum der Stichprobe erhoben werden und sind zudem auf einer kontinuierlichen Skala messbar (INSULL et al. 1990, BOND et al. 1991, GRENNLAND et al. 2000).

Für die Messung der IMT mittels B-Bild Sonographie (B für brightness) eignet sich insbesondere die A. carotis, da sie im Bereich des Halses relativ oberflächennah unter der Haut gelegen ist und deshalb mit hochauflösenden Sendefrequenzen im Bereich von 5 – 10 MHz untersucht werden kann. Dadurch ist eine ausreichende axiale Resolution gegeben, um Strukturen mit einer Dicke von weniger als 0,5 mm darstellen zu können. Die Messung der IMT mittels B-Bild Sonographie ist valide, d. h. sie stimmt in hohem Maße mit der tatsächlichen im histologischen Präparat bestimmten Dicke des Intima-Media Komplexes überein (PIGNOLI et al. 1986). Weiterhin ist sie reliabel, d. h. wiederholte Messungen desselben Untersuchers bzw. Messungen von verschiedenen Untersuchern zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung (PERSSON et al. 1992, RILEY et al. 1992). In epidemiologischen und pharmazeutisch-interventionellen Studien wird als gängiger Qualitätsstandard gefordert, dass die mittlere absolute Differenz wiederholter Messungen 0,1 mm nicht überschreiten soll (MERCURY et al. 1991, TANG et al. 2000).

Multiple epidemiologische Querschnittsuntersuchungen beschreiben sowohl eine Assoziation der IMT der A. carotis mit diversen kardiovaskulären Risikofaktoren (POLI et al. 1988, HEISS et al. 1991, SALONEN et al. 1991, O'LEARY et al. 1996,

HOWARD et al. 1997, STENSLAND-BUGGE et al. 2001) als auch mit prävalenten kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen (BURKE et al. 1995, O'LEARY et al. 1999) sowie mit atherosklerotischen Gefäßerkrankungen in anderen Regionen des arteriellen Gefäßsystems (BOTS et al. 1994). Darüber hinaus haben longitudinale Studien die IMT der A. carotis als zuverlässigen Prädiktor für zukünftige inzidente Myokardinfarkte und Schlaganfälle beschrieben (BOTS et al. 1997, CHAMBLESS et al. 1997, CHAMBLESS et al. 2000). Die IMT gilt daher als ein Surrogatmarker für eine generalisierte Atherosklerose bzw. für die Belastung eines Individuums durch generalisierte Atherosklerose. D. h. die Messung der IMT erfasst ein subklinisches Krankheitsstadium, noch bevor erste klinische Ereignisse auftreten.



## **1.5. Der ACE-Polymorphismus und subklinische Atherosklerose**

In Anbetracht eines gewebsständigen im Gefäßendothel lokalisierten RAS und der Rolle des ACE bei der Pathogenese atherosklerotischer Gefäßläsionen erscheint es plausibel, einen Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und subklinischen atherosklerotischen Gefäßläsionen zu postulieren. Die EVA-Studie (Etude sur le vieillissement arterial) wies erstmals eine Assoziation zwischen einer erhöhten Enzymaktivität im Plasma und der mittleren IMT der A. carotis communis nach (BONITHON-KOPP et al. 1994).

Nachfolgend zeigten kleinere bevölkerungsbezogene Studien einen schwachen positiven Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und der IMT. Die Vobarno Studie wies eine signifikant positive Assoziation lediglich bei 143 Teilnehmern nach, die keine antihypertensive medikamentöse Behandlung aufwiesen (CASTELLANO et al. 1995). Eine weitere italienische Studie bestätigte diese positive Assoziation an 132 gesunden Männern, die jünger als 55 Jahre alt waren (PUJIA et al. 1996). Das finnische Oulu Project Elucidating Risk of Atherosclerosis (OPERA) zeigte an 600 hypertensiven Teilnehmern eine schwache Assoziation zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und der IMT, die durch Nikotinabusus modifizierbar ist. Sie geht mit einer stärkeren Ausprägung bei Nichtrauchern einher und ist bei Rauchern nicht mehr nachweisbar (KAUMA et al. 1996). Schließlich wies eine japanische Studie an 288 Patienten mit Typ 2 Diabetes das D-Allel als unabhängigen Prädiktor der IMT der A. carotis in einem multivariaten Modell nach (HOSOI et al. 1996). Andere Studien konnten hingegen keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und der IMT der A. carotis in verschiedenen Patientenkollektiven oder Bevölkerungsstichproben feststellen. Diese Studien untersuchten beispielsweise Patienten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus, die jünger als 44 Jahre alt waren (FROST et al. 1998), Patienten mit Alkoholabusus (BEDNARSKA-MAKARUK et al. 2005) oder verglichen unterschiedliche Ethnien (MARKUS et al. 2001).

Eine Assoziation der ACE-Aktivität im Plasma bzw. des ACE I/D-Polymorphismus mit atherosklerotischen Plaques wurde hingegen nicht beschrieben (BONITHON-KOPP et al. 1994, CASTELLANO et al. 1995, DESSÌ-FULGHERI et al. 1995, PUJIA et al. 1996). Lediglich eine Studie aus Tübingen berichtet über eine signifikant positive Assoziation mit Stenosen der A. carotis interna mit einer über 50%igen Lumeneinengung (PFOHL et al. 1998).

Neben diesen kleineren Studien, die meist retrospektiv aus einer selektionierten Subpopulation von bevölkerungsbezogenen Studien herrühren und somit sowohl der Gefahr eines Selektions-Bias unterliegen als auch nur eine geringe statistische Trennschärfe aufweisen, existieren vier größere bevölkerungsbasierte Studien. Diese wurden erst nach der in dieser Dissertation beschriebenen Analyse der Daten der SHIP publiziert:

Eine nordamerikanische Studie untersuchte die bevölkerungsbasierten Daten von 495 Männern und Frauen zwischen 45 und 64 Jahren aus zwei Zentren aus Forsyth County, North Carolina, und Minneapolis, Minnesota. Diese nahmen sowohl an der Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study als auch an der NHLBI Family Heart Study teil (ARNETT et al. 1998). Die australische Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS) untersuchte 1111 Probanden zwischen 20 und 70 Jahren (HUNG et al. 1999). Die japanische Suita Studie untersuchte 3657 Probanden zwischen 30 und 79 Jahren aus der Region Osaka (MANNAMI et al. 2001). Keine dieser drei Studien konnte weder in der Analyse der gesamten Stichprobe noch in diversen Subgruppenanalysen einen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der IMT der A. carotis nachweisen. Durch die Analyse der ARIC/NHLBI-Daten konnte außerdem kein Zusammenhang zwischen der Aktivität des ACE im Plasma und der IMT der A. carotis festgestellt werden. Die bevölkerungsbasierte Rotterdam Studie analysierte bei 5321 Individuen, die alle älter als 55 Jahre waren, den Zusammenhang zwischen dem ACE-Polymorphismus und der Carotis-IMT in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (SAYED-TABATABAEI et al. 2004). Dieses Vorgehen wird dadurch begründet, dass in einer Subgruppe von 212 Individuen lediglich der ACE-Polymorphismus und das Rauchverhalten die ACE-Aktivität im Serum signifikant beeinflussen und in einer multiplen Regressionsanalyse 28%

der Varianz der ACE-Aktivität im Serum durch diese beiden Variablen bestimmt werden. Bei einem Vergleich der IMT der A. carotis von aktuellen Rauchern mit der von Nichtrauchern bzw. ehemaligen Rauchern wurde in einer nach Alter und Geschlecht adjustierten Analyse eine signifikant höhere IMT bei aktuellen Rauchern mit dem homozygoten DD-Genotyp im Vergleich zu aktuellen Rauchern mit II-Genotyp und im Vergleich zu Nicht- bzw. ehemaligen Rauchern mit II-Genotyp festgestellt. Im Gegensatz dazu war keine Assoziation zwischen der IMT und dem D-Allel bei Nicht- oder ehemaligen Rauchern festzustellen. Für die Analyse der gesamten Population sowie für alle anderen Subgruppenanalysen wurde hingegen kein signifikanter Unterschied der IMT zwischen Individuen mit dem DD- oder II-Genotyp festgestellt.

## 1.6. Fragestellung

Das Design der vorliegenden Arbeit wurde vor dem Hintergrund entwickelt, dass die Auswertung der Daten der ECTIM-Studie sowohl einen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der ACE-Aktivität im Plasma als auch zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten erbracht hatte und dass anschließende kleinere Fall-Kontroll-Studien mit klinischen Endpunkten widersprüchliche Ergebnisse hervorgebracht hatten. Das Rational der vorliegenden Arbeit liegt darin begründet, dass sowohl Angiotensin II als auch Bradykinin biologisch hochaktive Peptidhormone darstellen, die erheblichen Einfluss auf den Gefäßwandtonus, die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und auf die Produktion extrazellulärer Matrix ausüben. Zudem steht die Aktivität des zirkulierenden und wahrscheinlich auch des gewebsständigen ACE unter einer deutlichen genetischen Kontrolle, wobei die Enzymaktivität zwischen den einzelnen Genotypen um den Faktor 20 bis 40 variiert. Der Einfluss einer chronischen Einwirkung einer erhöhten Enzymaktivität auf die Genese atherosklerotischer Gefäßwandläsionen erscheint somit plausibel. Die Rolle des ACE I/D-Polymorphismus als einen Risikofaktor für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen würde umso deutlicher, wenn bereits frühe atherosklerotische Gefäßveränderungen in Abhängigkeit vom ACE I/D-Polymorphismus in einer großen bevölkerungsbasierten Studie nachgewiesen werden könnten. Zum Zeitpunkt, als die vorliegende Studie projektiert wurde, lagen zu dieser Fragestellung noch keine Daten einer großen bevölkerungsbasierten Studie vor.

Ziel der vorliegenden Studie ist somit die Untersuchung der Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der Intima-Media-Dicke in der A. carotis als einen Surrogatparameter für generalisierte subklinische atherosklerotische Gefäßwandläsionen. Analysiert wurden dazu Daten der „Study of Health in Pomerania“ (SHIP), einer bevölkerungsbasierten epidemiologischen Querschnittsstudie in der Region Vorpommern im Nordosten Deutschlands.

## **2. Methoden**

### **2.1. Die SHIP-Studie**

Die Studie „Leben und Gesundheit in Vorpommern“ (englisch Study of Health in Pomerania, SHIP) ist eine epidemiologische Untersuchung im Rahmen des Forschungsverbundes „Community Medicine“ an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Ziel dieser Basiserhebung ist es, Häufigkeiten und Verteilungen von relevanten Erkrankungen, wie Herz-Kreislaufkrankungen, neurologischen Erkrankungen, Diabetes mellitus, Erkrankungen des Zahn- und Kauapparates, von potentiellen Risikofaktoren sowie von Lebensstil-Faktoren und sozioökonomischen Faktoren regional zu erfassen. Sie dient der Beschreibung des regionalen Gesundheitszustandes und ist darüber hinaus notwendige Datenbasis für die Konzeption und Durchführung von intervenierenden und beobachtenden Längsschnittuntersuchungen.

Die Studie umfasst die Städte Greifswald, Stralsund und Anklam sowie weitere 29 Gemeinden der umgebenden Region Vorpommerns. Aus der Gesamtpopulation von 212.157 Personen wurde eine repräsentative, nach Alter stratifizierte Stichprobe von 7.008 Personen zwischen 20 – 79 Jahren aus Melderegistern ausgewählt (JOHN et al. 2001). In Anlehnung an das WHO MONICA (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Project Augsburg wurden getrennt nach Geschlechtern 12 Fünfjahresaltersgruppen (20 bis 79 Jahre) mit je 292 Personen gebildet (KEIL et al. 1985, WHO MONICA).

Die vorliegende Arbeit analysiert Daten aus der Basisstudie SHIP-0 und entspricht somit einer Querschnitts-Studie. Daten aus der ersten longitudinalen Folgestudie SHIP-1, die im Abstand von 5 Jahren erfolgte, gehen nicht in diese Arbeit ein. Während der Erhebungsperiode der SHIP-0 von Oktober 1997 bis Mai 2001 haben 4310 Probanden an SHIP teilgenommen, dies entspricht einer Response-Rate von 68,8%. Das Design der SHIP-Studie wurde der Ethikkommission der Landesärztekammer Mecklenburg-Vorpommern vorgelegt.

Von jedem Teilnehmer liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie vor.

## **2.2. Datenerhebung**

Mittels eines computerunterstützten face-to-face Interviews wurden soziodemographische Daten, Fragen zur medizinischen Vorgeschichte, zu Medikamenten, zu verhaltensbedingten Risikofaktoren und zu gesundheitsrelevanten Lebensgewohnheiten erhoben. Ein Hypertonus wurde angenommen, wenn (a) die Diagnose durch einen Arzt gestellt wurde, (b) eine Behandlung mit einem antihypertensiven Medikament besteht oder (c) der gemessene arterielle Blutdruck Werte über 140/90 mmHg überstieg. Systolischer und diastolischer Blutdruck wurden beim sitzenden Probanden am rechten Arm mittels eines HEM705CP Blutdruck-Monitors (OMRON Corporation, Tokyo, Japan) gemessen (O'BRIEN et al. 1996). Aus der zweiten und dritten Messung wurde dann ein Mittelwert gebildet.

Ein Diabetes mellitus wurde angenommen, wenn (a) die Diagnose durch einen Arzt gestellt wurde oder (b) eine Behandlung mit einem antidiabetischen Medikament besteht. Der Risikofaktor „Zigaretten Rauchen“ wurde in drei Kategorien klassifiziert: Nichtraucher, ehemalige Raucher und aktuelle Raucher, die eine oder mehrere Zigaretten pro Tag rauchen.

Blutentnahmen erfolgten aus der V. cubitalis bei liegendem Probanden in Vakuümröhrchen. Die Proben wurden innerhalb von 3 Stunden in einem klinisch-chemischen Labor analysiert. Die partizipierenden Labore der SHIP Studie nahmen während der Studienperiode halbjährlich in der offiziellen deutschen INSTAND „round-robin test“ - Serie zur Qualitätssicherung teil. Außerdem wurden Blutproben in jedem Studienzentrum einmal pro Woche zur internen Qualitätssicherung doppelt analysiert.

Das Gesamtcholesterin im Serum wurde durch enzymatische Methoden (CHOD-PAP), das high density lipoprotein (HDL) Cholesterin nach Magnesiumchlorid Präzipitation und das low density lipoprotein (LDL) Cholesterin nach

Dextransulfat Präzipitation bestimmt (FRIEDEWALD et al. 1972, WARNICK et al. 1982, SIEDEL et al. 1983).

### **2.3. Ultraschalluntersuchungen der Arteria carotis**

Ultraschalluntersuchungen der A. carotis wurden auf insgesamt 2515 Teilnehmer, die 45 Jahre oder älter waren, beschränkt, da bei jüngeren Teilnehmern keine wesentlichen atherosklerotischen Veränderungen zu erwarten gewesen wären. Die Untersuchung der rechten und linken A. carotis erfolgte mittels B-Bild Sonographie und cw-Dopplersonographie zur Untersuchung der IMT sowie zur Untersuchung von atherosklerotischen Plaques und Stenosen der A. carotis interna.

Bei 78 Probanden ließ die Bildqualität der Ultraschalluntersuchung keine zuverlässige Beurteilung der IMT zu, so dass eine Messung der IMT nur bei 2437 Probanden erfolgte.

#### **2.3.1. Die Intima-Media-Dicke im Ultraschallbild**

Die Wand normaler elastischer und muskulärer Arterien setzt sich aus drei Schichten zusammen:

Tunica intima (synonym: Intima), Tunica media (synonym: Media) und Tunica externa (synonym: Adventitia). Die Intima besteht aus dem Endothel, einem geschlossenen einschichtigen Verband flacher Zellen, die in der Regel auf einer Basalmembran ruhen und aus dem subendothelialen Bindegewebe mit zarten Kollagenfasern und elastischen Netzen. Sie ist die innerste und dünnste Schicht. Allerdings ist sie auch die anatomische Struktur, in der sich die zur Atherosklerose führenden inflammatorischen Prozesse abspielen, so dass die atherosklerotisch veränderte Intima an Dicke zunimmt.

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern, elastischen Fasern und ist die dickste Schicht in einer normalen Arterie.

Die Adventitia ist ein Geflecht aus Kollagenfasern mit unterschiedlich vielen elastischen Netzen. Die Geflechte verankern die Gefäße in ihrer Umgebung.

Bei der auf einem Puls-Echo-Verfahren beruhenden B-Bild Sonographie kommt es zur Reflexion des Ultraschalls an Grenzflächen von Medien bzw. Geweben unterschiedlicher akustischer Impedanz. Diese Grenzflächenreflexion führt im Ultraschallbild zu einer hellen Linie, deren Dicke von der Pulslänge des emittierten Ultraschalls abhängt. Die Gefäßwand der A. carotis zeigt im Ultraschallbild eine Doppellinien-Kontur, die dadurch entsteht, dass Ultraschall an der Grenzfläche zwischen dem Gefäßlumen und der Intima sowie zwischen der Media und Adventitia reflektiert wird. Eine Abgrenzung zwischen Intima und Media gelingt nicht, weshalb der Abstand der Linien der Doppellinien-Kontur die Dicke des Intima-Media-Komplexes widerspiegelt. Diese Annahme wurde in-vitro bestätigt, indem an einem Präparat der Aorta und der A. carotis nach Entfernen der Intima die innere Linie der Doppellinien-Kontur im Ultraschallbild verschwand und nach Entfernen der Adventitia die äußere Linie nicht mehr nachzuweisen war (PIGNOLI et al. 1986).

### **2.3.2. Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis**

Die Untersuchung der IMT erfolgte mittels B-Bild Sonographie unter Verwendung eines hoch auflösenden Ultraschallgerätes (VST Gateway, General Electric DIASONICS, Santa Clara, USA) und eines 5 MHz Linearschallkopfes. Zertifizierte technische Assistenten (Observer) untersuchten beidseitig die extrakranielle A. carotis. Zur Bestimmung der IMT wurden Längsschnittaufnahmen der rechten und linken A. carotis communis in ihrem distalen geraden Abschnitt 1 cm unterhalb der Carotis-Bifurkation auf S-VHS Videoband aufgezeichnet. Dabei wurde die Carotis-Bifurkation als der Beginn der Aufweitung der A. carotis communis unter Verlust der Parallelität ihrer Gefäßwände definiert. Während dessen war darauf zu achten, dass der Ultraschallstrahl durch das Zentrum des Gefäßlumens gerichtet wurde, so dass er senkrecht auf die hintere Gefäßwand auftraf und somit eine typische Doppellinienkontur der Gefäßwand mit scharf begrenzten, eindeutig zu



definierenden Grenzflächen zur Darstellung kam (Abbildung 2.1). Die Videobänder wurden durch geübte und zertifizierte Auswerter (Reader) zentral ausgewertet. Nach der Digitalisierung der Videoaufnahmen (ImageP2/ULTRAFRAME System) wurde ein Längsschnitt der A. carotis communis mit den oben genannten Kriterien entsprechender optimaler Darstellung der dem Schallkopf fernen Gefäßwand (so genannte far wall) ausgewählt. Danach erfolgten im Bereich eines Abschnitts von 1 cm Länge an der dem Schallkopf fernen Gefäßwand der distalen A. carotis communis unmittelbar unterhalb der Carotis-Bifurkation 10 konsekutive Messungen der IMT in je 1 mm Abstand. Gemessen wurde jeweils zwischen den dem Schallkopf zugewandten Rändern der jeweiligen Linie (so genannte leading edge) der Doppellinien-Kontur der Gefäßwand. Die in den weiteren Analysen verwendete mittlere IMT errechnete sich aus dem arithmetischen Mittel der insgesamt 20 Messpunkte der Messung beider Seiten.

Die Schallköpfe des Ultraschallgerätes wurden nach ihrer Funktion der piezoelektrischen Kristalle und deren Auflösung mittels eines gewebesimitierenden Phantoms (RMI403GS ultrasound tissue mimicking phantom; GAMMEX RMI, Middleton, USA) einmal pro Woche überprüft. Die Variabilität der Messungen von verschiedenen Observer und Reader sowie die Variabilität von wiederholten Aufnahmen bzw. Messungen desselben Observers bzw. Readers (wiederholte Video-Aufzeichnungen der A. carotis von 5 Probanden bzw. wiederholte Auswertung von zweifachen Sets von 25 Video-Aufzeichnungen) wurden bei halbjährigen Zertifizierungsprüfungen bestimmt (LÜDEMANN et al. 2000). Die Spearman Korrelations-Koeffizienten der intra-observer und intra-reader Messungen waren  $> 0,95$  und  $> 0,97$ ; die mittleren Differenzen waren  $< 1\%$  ( $2SD < 10\%$ ). Die Spearman Korrelations-Koeffizienten der between-observer und between-reader Variabilitäten waren  $> 0,90$  und  $> 0,95$ ; die mittleren Differenzen waren  $< 5\%$  ( $2SD < 15\%$ ).

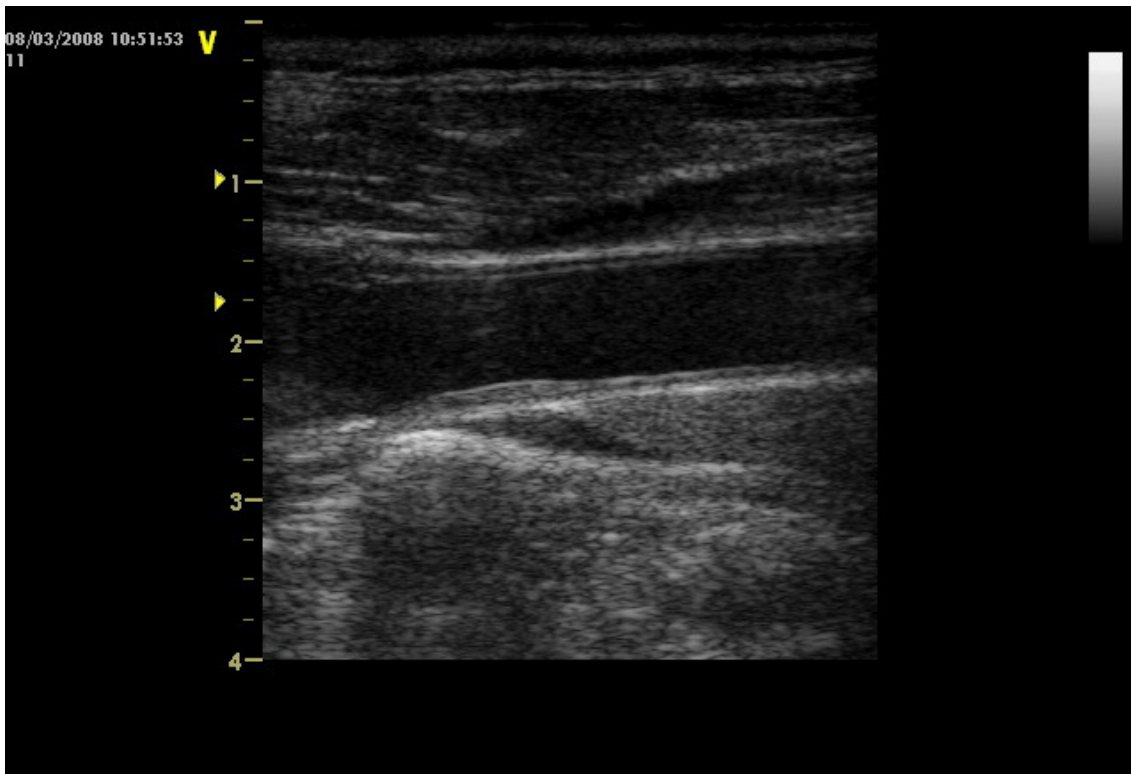


Abbildung 2.1: Ultraschall-Bild der A. carotis communis mit Darstellung der Doppellinien-Kontur der Gefäßwand, die sowohl an der Vorder- als auch an der Hinterwand der A. carotis nachzuweisen ist. Die beiden Linien stellen die Grenzfläche zwischen dem Gefäßlumen und der Intima bzw. zwischen der Media und der Adventitia dar.

### **2.3.3. Bestimmung von atherosklerotischen Plaques der Arteria carotis**

Die Untersuchung nach atherosklerotischen Plaques erfolgte ebenfalls mittels B-Bild Sonographie unter Verwendung der gleichen Methodik wie bei der IMT-Bestimmung. Es erfolgte die sonographische Untersuchung der dem Schallkopf nahen und fernen Gefäßwand der folgenden arteriellen Segmente: A. carotis communis, Carotis-Bifurkation sowie Aa. carotis externa und interna beider Seiten. Untersucht wurde jeweils ein Abschnitt von 1 cm Länge der distalen A. carotis communis unterhalb der Carotis-Bifurkation bzw. der proximalen A. carotis interna bzw. externa oberhalb des Strömungsteilers. Plaques wurden

definiert als eine fokale Verdickung der Gefäßwand mit Protrusion in das Gefäßlumen. Quantitativ ausgewertet wurde die Anzahl der arteriellen Segmente, in denen mindestens ein Plaque nachzuweisen war. Die Dicke der Plaques wurde nicht gemessen.

#### **2.3.4. Bestimmung von Stenosen der Arteria carotis**

Die Untersuchung nach Stenosen erfolgte mittels cw-Dopplersonographie (DWL Multi-Dop, DWL, Sipplingen, Deutschland) unter Verwendung eines 4 MHz Schallkopfes. Untersucht wurden die Dopplerspektren der rechten und linken Aa. carotis communis interna und externa. Eine Stenose mit einer mindestens 50%igen Lumen-Einengung wurde durch eine Zunahme der maximalen Dopplerfrequenz des Dopplerspektrums an einer umschriebenen Stelle des Gefäßverlaufes mit niedrigeren Dopplerfrequenzen proximal und distal dieses Gefäßabschnittes definiert, sofern sie sich eindeutig von dem schrittweisen Anstieg der maximalen Dopplerfrequenzen am Übergang der A. carotis communis zur A. carotis interna unterschied. Eine Zunahme der maximalen Dopplerfrequenz auf Werte über 6 kHz oder eine Zunahme niederfrequenter Frequenz-Anteile im Dopplerspektrum oder Frequenz-Anteile, die für eine retrograde Strömungsrichtung sprechen, unterstützten die Diagnose (VON REUTERN 1993). Optional kann der Befund mittels Spektrumanalyse bei der Duplexsonographie unter Verwendung des oben genannten Duplex-Ultraschallgerätes (VST Gateway, General Electrics DIASONICS, Santa Clara, USA) verifiziert werden.

## 2.4. Genetische Analyse

Die genetischen Analysen wurden im Institut für Humangenetik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt. Es wurden die Blutproben von 4310 Teilnehmern molekulargenetisch untersucht. Von insgesamt 4262 Probanden wurde die genomische DNA präpariert und in die CM-DNA-Bank eingelagert, registriert und verwaltet. Personenbezogene Daten liegen dem Institut nicht vor.

Die DNA-Präparation und die Genotypisierung des ACE-Polymorphismus mittels PCR wurde ausführlich durch HERRMANN et al. (2001) beschrieben und soll hier nur kurz dargestellt werden.

Die DNA-Präparation erfolgte nach Standardvorschrift mit der phenolfreien Aussalzmethode (MILLER et al. 1988). Anschließend wurden die DNA-Proben in einer separaten Tiefkühltruhe gelagert.

Die nachfolgenden Genotypisierungen erfolgten mittels PCR, welche in zwei Schritten durchgeführt wurde. Die erste PCR wurde mit insertflankierenden Primern unter Zusatz von 5% DMSO durchgeführt (RIGAT et al. 1992), während bei der zweiten PCR insertspezifische Primer zum Einsatz kamen. Auch diese PCR erfolgte mit dem Zusatz von DMSO, um die Genauigkeit der Typisierung des ACE-Gens zu verbessern. Damit sollte eine zu niedrige Bestimmung der Heterozygoten und die damit verbundene Überpräsentation des DD-Genotyps verhindert werden (ODAWARA et al. 1997).

## **2.5. Statistische Methoden**

Die Analyse der Daten aus der SHIP-Studie erfolgte mittels des SAS 8.2 Software-Systems. Die Angabe der Daten erfolgte je nach Datenstruktur in absoluten Häufigkeitswerten, Prozentwerten sowie Mittelwerten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Zum Gruppenvergleich bei kategorisierten Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test, bei kontinuierlichen Variablen der t-Test angewendet (ROSNER 2000). Eine potentielle Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium wurde ebenfalls mittels Chi-Quadrat-Test bestimmt (CHRISTENSEN 2004). Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem ACE-Polymorphismus und Stenosen der A. carotis nach Adjustierung für die üblichen vaskulären Risikofaktoren erfolgte mittels multivariater logistischer Regressionsanalyse.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Risikofaktoren für kardiovaskuläre bzw. zerebrovaskuläre Erkrankungen

Eine Übersicht über Risikofaktoren für kardiovaskuläre bzw. zerebrovaskuläre Erkrankungen in der Gesamtstichprobe, getrennt nach Männern und Frauen, zeigt die Tabelle 3.1.

<b>Zerebrovaskuläre Risikofaktoren</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>Gesamtstichprobe</b>
Cholesterol [mmol/l]	5,8 (SD 0,17)	5,8 (SD 1,25)	5,8 (SD 1,24)
Triglyceride [mmol/l]	2,1 (SD 1,24)	1,6 (SD 1,23)	1,9 (SD 1,46)
HDL-Cholesterol [mmol/l]	1,3 (SD 1,61)	1,6 (SD 0,45)	1,5 (SD 0,44)
LDL-Cholesterol [mmol/l]	3,6 (SD 0,38)	3,5 (SD 1,17)	3,6 (SD 1,16)
Lipoprotein (a) [mg/l]	203,5 (SD 268,5)	221,9 (SD 293,9)	212,9 (SD 281,9)
Apolipoprotein A1 [g/l]	1,5 (SD 0,29)	1,7 (SD 0,31)	1,6 (SD 0,32)
Apolipoprotein B [g/l]	1,0 (SD 0,25)	0,9 (SD 0,23)	1,0 (SD 0,24)
Systolischer Blutdruck [mmHg]	142,6 (SD 19,42)	129,9 (SD 21,31)	136,1 (SD 21,37)
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	85,9 (SD 11,42)	80,9 (SD 10,75)	83,4 (SD 11,35)
Zigaretten Rauchen [Pack-Years]	11,8 (SD 10,92)	7,0 (SD 6,77)	9,7 (SD 9,66)
HbA1c (%) [mmol/l]	5,5 (SD 0,99)	5,4 (SD 0,89)	5,5 (SD 0,94)
Glucose (Serum) [mmol/l]	5,9 (SD 1,95)	5,5 (SD 1,61)	5,7 (SD 1,80)

SD = Standard Deviation

Pack-Years = Anzahl der Jahre mit 1 Päckchen Zigaretten pro Tag

Tabelle 3.1: Risikofaktoren für kardiovaskuläre bzw. zerebrovaskuläre Erkrankungen

### 3.2. Prävalenz vaskulärer Erkrankungen

Bezüglich vaskulärer Erkrankungen in der Anamnese berichteten 7,7% der Befragten einen Herzinfarkt und 7,2% eine Claudicatio intermittens. Angina pectoris (2,9%) und Schlaganfall (2,3%) wurden seltener genannt. Während bei Männern Herzinfarkte am häufigsten zu finden sind, stehen bei Frauen periphere Verschlusskrankheiten an erster Stelle.

<b>Vaskuläre Erkrankungen</b>	<b>Männer n (%)</b>	<b>Frauen n (%)</b>	<b>Gesamt- population n (%)</b>
<b>Myokardinfarkt</b>	212 (10,1)	120 (5,5)	332 (7,7)
<b>Claudicatio intermittens</b>	140 (6,6)	171 (7,8)	311 (7,2)
<b>Angina Pectoris</b>	47 (2,2)	76 (3,5)	123 (2,9)
<b>Schlaganfall</b>	65 (3,1)	33 (1,5)	98 (2,3)

n = Anzahl

Tabelle 3.2: Prävalenzen vaskulärer Erkrankungen

### 3.3. Häufigkeiten der ACE-Genotypen in der Gesamtstichprobe

Von den 4310 Teilnehmern von SHIP-0 wurde bei 4262 Personen (98,9%) der ACE-Polymorphismus bestimmt, lediglich bei 48 Personen liegen keine Daten bezüglich der genetischen Untersuchung vor. Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen des ACE-Polymorphismus sind in Tabelle 3.3 gelistet.

<b>ACE-Polymorphismen</b>	<b>n (%)</b>
<b>II</b>	1031 (23,9)
<b>ID</b>	2131 (49,4)
<b>DD</b>	1100 (25,5)
<b>Σ</b>	4262 (98,9)

Tabelle 3.3: Prävalenzen der Genotypen des ACE-Polymorphismus

Die gentechnische Analyse der DNA ergab, dass 1031 Personen (23,9%) den Genotyp II besitzen, 2131 Personen (49,4%) haben den Genotyp ID und 1100 (25,5%) der Untersuchten zeigen den Genotyp DD (Abbildung 3.1). Dies entspricht einer Verteilung der Genotypen von 1:2:1 und damit den Erwartungen bei einer Verteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.



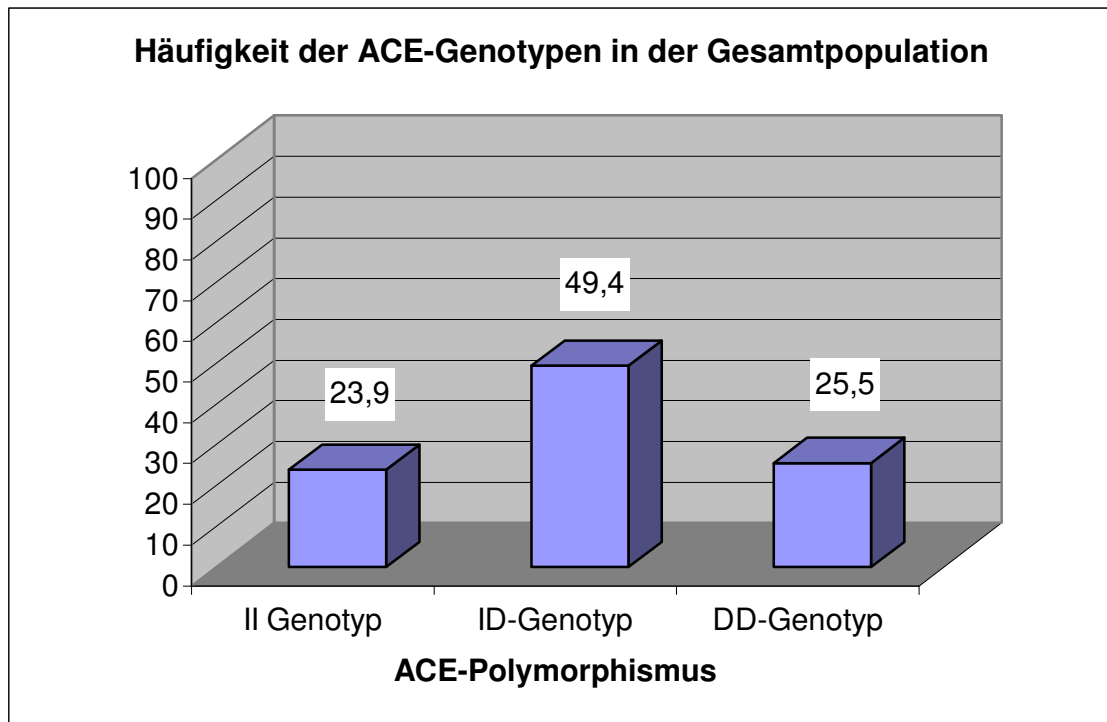


Abbildung 3.1: Häufigkeiten der ACE-Genotypen

### 3.4. Vergleich der Häufigkeit von vaskulären Erkrankungen in der Anamnese in Abhängigkeit des ACE-Genotyps

Bezüglich des Auftretens von Herzinfarkten in der Anamnese wurde bei Frauen, die älter als 55 Jahre alt waren, ein häufigeres Auftreten von Herzinfarkten in der Gruppe der Frauen mit dem II-Genotyp als bei denen mit dem DD-Genotyp (11,65% versus 6,34%) festgestellt. Diese sind jedoch statistisch nicht signifikant. Bei jüngeren Frauen und bei Männern konnten unabhängig von der Altersgruppierung hingegen keine Unterschiede festgestellt werden.

	<b>II-Genotyp n (%)</b>	<b>DD- Genotyp n (%)</b>	$\Sigma$
<b>Herzinfarkt</b>	24 (11,7)	13 (6,3)	37
<b>Kein Herzinfarkt</b>	182 (88,3)	192 (93,7)	374
$\Sigma$	206	205	411
<b>Signifikanz:</b> $p = 0,088$			

Tabelle 3.4: Auftreten von Herzinfarkten bei Frauen, die älter als 55 Jahre alt waren

Für die übrigen vaskulären Erkrankungen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich deren Häufigkeit im Vergleich von Probanden mit dem DD-Genotyp zu solchen mit dem II-Genotyp gefunden werden. Auch in Subgruppenanalysen fanden sich getrennt nach dem Geschlecht oder dem Alter der Probanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht tabellarisch dargestellt).

### 3.5. Atherosklerotische Gefäßwandläsionen

Eine Ultraschalluntersuchung der A. carotis mit Bestimmung der IMT wurde bei 2437 Probanden durchgeführt. Die durchschnittliche IMT aller Probanden betrug 0,795 mm (SD 0,171 mm). Atherosklerotische Plaques in der A. carotis wurden bei insgesamt 70,8% der Probanden (64,9% der Frauen; 76,4% der Männer) festgestellt. Plaques, die zu einer Stenosierung des Gefäßlumens von mehr als 50% geführt haben, wurden dagegen nur bei insgesamt 4,1% der Probanden gefunden. Der Anteil der Stenosen bei den Männern war allerdings mit 5,6% doppelt so hoch wie bei den Frauen.

	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>Gesamt- population</b>
<b>Mittlere IMT (mm)</b>	0,835 (SD 0,173)	0,753 (SD 0,160)	0,795 (SD 0,171)
<b>Carotis-Plaques n</b> <b>(%)</b>	973 (76,4)	797 (64,9)	1770 (70,8)
<b>Carotis-Stenosen n</b> <b>(%)</b>	71 (5,6)	31 (2,5)	102 (4,1)

Tabelle 3.5: Mittlere Carotis-IMT und Nachweis von Plaques und Stenosen in der A. carotis

### 3.6. Vergleich der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis bei Probanden mit II- und DD- Genotyp

Der Vergleich der durchschnittlichen Carotis-IMT in Abhängigkeit des Genotyps ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Probanden mit dem DD-Genotyp im Vergleich zu denen mit dem II-Genotyp (Tab. 3.6.1).

	II- Genotyp		DD- Genotyp		Sig-nifi-kanz
	n	IMT	n	IMT	
<b>Männer</b>	308	0,839 ± 0,190	327	0,841 ± 0,185	n. s.
<b>Frauen</b>	287	0,739 ± 0,132	291	0,760 ± 0,161	n. s.
<b>Σ</b>	595		618		

n. s. = nicht signifikant

Tabelle 3.6.1: Mittlere Carotis-IMT in Abhängigkeit der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus

Auch nach getrennter Analyse von Teilnehmern an SHIP-0, die jünger als 55 Jahre waren (Tab. 3.6.2), und jenen, die älter als 55 Jahre waren (Tab. 3.6.3), bestanden in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Carotis-IMT, wenn jeweils Probanden mit homozygotem II- und DD-Genotyp verglichen wurden.

	<b>II- Genotyp</b>		<b>DD- Genotyp</b>		<b>Signi- fikanz</b>
	<b>n</b>	<b>IMT</b>	<b>n</b>	<b>IMT</b>	
<b>Männer</b>	82	0,744 ± 0,156	93	0,764 ± 0,150	n. s.
<b>Frauen</b>	90	0,662 ± 0,756	88	0,671 ± 0,095	n. s.
<b>Σ</b>	172		181		

Tabelle 3.6.2: Mittlere Carotis-IMT in Abhängigkeit der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus bei Teilnehmern von SHIP-0, die jünger als 55 Jahre alt waren

	<b>II- Genotyp</b>		<b>DD- Genotyp</b>		<b>Signi- fikanz</b>
	<b>n</b>	<b>IMT</b>	<b>n</b>	<b>IMT</b>	
<b>Männer</b>	226	0,873 ± 0,190	234	0,872 ± 0,188	n. s.
<b>Frauen</b>	197	0,774 ± 0,137	203	0,798 ± 0,168	n. s.
<b>Σ</b>	423		437		

Tabelle 3.6.3: Carotis-IMT in Abhängigkeit der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus bei Teilnehmern von SHIP-0, die älter als 55 Jahre alt waren

Die nachfolgende Tabelle beschreibt die Verteilung der homozygoten Genotypen bei Frauen mit IMT-Werten > 1 mm (Tab. 3.6.4).

	<b>II- Genotyp</b> n (%)	<b>DD- Genotyp</b> n (%)	$\Sigma$
<b>IMT &gt; 1 mm</b>	11 (3,8)	22 (7,6)	33
<b>IMT &lt; 1 mm</b>	267 (96,2)	269 (92,4)	545
$\Sigma$	287	291	593
<b>Signifikanz:</b> $p = 0,053$			

Tabelle 3.6.4: Verteilung der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus bei Teilnehmern mit IMT-Werten > 1 mm

Bei Frauen mit IMT-Werten > 1 mm lag häufiger der DD-Genotyp als der II-Genotyp (7,6% versus 3,8%) vor. Diese Unterschiede waren grenzwertig signifikant ( $p = 0,053$ ). Bei Männern mit IMT-Werten > 1 mm zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ACE-Polymorphismus.

### 3.7. Vergleich der Häufigkeiten von atherosklerotischen Plaques in der Arteria carotis bei Teilnehmern mit homozygotem II- und DD-Genotyp

Atherosklerotische Plaques in der A. carotis waren häufiger bei Frauen mit dem homozygoten DD-Genotyp als bei Frauen mit dem II-Genotyp (67,6% versus 60,5%) nachweisbar (Tab. 3.7.1). Dieser Vergleich erreichte mit 0,075 allerdings nur ein grenzwertiges statistisches Signifikanzniveau. Hierbei ist der Unterschied am stärksten durch junge Frauen (Frauen unter 55 Jahren) determiniert, während bei älteren Frauen, ebenso wie bei Männern diese Unterschiede nicht mehr statistisch signifikant nachzuweisen waren (Tab. 3.7.2).

	<b>II- Genotyp n (%)</b>	<b>DD- Genotyp n (%)</b>	$\Sigma$
<b>Plaque</b>	178 (60,5)	202 (67,6)	380
<b>Keine Plaque</b>	116 (39,5)	97 (32,4)	213
$\Sigma$	294	299	593
<b>Signifikanz:</b> $p = 0,075$			

Tabelle 3.7.1: Verteilung der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Nachweis von Plaques bei Frauen

	<b>II- Genotyp n (%)</b>	<b>DD- Genotyp n (%)</b>	$\Sigma$
<b>Auftreten von Plaque</b>	23 (25,3)	35 (37,2)	58
<b>Keine Plaque</b>	68 (74,7)	59 (62,8)	127
$\Sigma$	91	94	185
<b>Signifikanz:</b> $p = 0,080$			

Tabelle 3.7.2: Verteilung der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Nachweis von Plaques bei Frauen, die jünger als 55 Jahre alt waren



### 3.8. Subgruppenanalyse

Die Subgruppenanalyse wurde bei Männern durchgeführt, die keinen Diabetes mellitus aufwiesen und keinen Nikotinabusus aufwiesen. Dabei sollte eine Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und Stenosen der A. carotis >50% nachgewiesen werden.

Diabetiker und Raucher wurden ausgeschlossen, da sowohl ein Diabetes mellitus als auch Zigarettenkonsum Risikofaktoren für eine fortgeschrittene Atherosklerose darstellen. Zudem könnten sie den Effekt des ACE-Polymorphismus maskieren (Tab. 3.8).

	<b>II-Genotyp</b>	<b>DD-Genotyp</b>
<b>Gesamtpopulation</b>	2%	2,9%
<b>Teilnehmer <u>ohne</u> Diabetes mellitus und <u>ohne</u> Nikotinabusus</b>	2,8%	6,7%
<b>Signifikanz:</b> $p = < 0,03$		

Tabelle 3.8: Nachweis von Stenosen in der A. carotis >50% (n = 32) in Abhängigkeit der homozygoten Genotypen des ACE-Polymorphismus

Dabei zeigte sich, dass Stenosen der A. carotis >50% bei männlichen Teilnehmern an SHIP-0 mit dem homozygoten DD-Genotyp signifikant häufiger nachweisbar waren als der homozygote II-Genotyp ( $p < 0,03$ ). Bei Frauen war dieser Effekt nicht nachweisbar.

### 3.9. Multivariate logistische Regressionsanalyse

Um das Risiko von Stenosen der A. carotis für D-Allelträger abzuschätzen, wurde in der Subgruppe der Männer, die keinen Diabetes mellitus aufwiesen und keinen Nikotinabusus aufwiesen außerdem eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Das Regressionsmodell wurde für das Alter, den systolischen Bluthochdruck, den Raucherstatus sowie für das LDL- und HDL-Cholesterin im Serum adjustiert (Tab. 3.9).

	<b>Odds Ratio</b>	<b>95% Konfidenzintervall</b>
<b>II-Genotyp</b>	Referenz	
<b>ID-Genotyp</b>	1.21	0.44 – 3.35
<b>DD-Genotyp</b>	2.94	1.08 – 8.06
<b>Signifikanz:</b> $p = < 0,02$		

Tabelle 3.9: Multivariate logistische Regressionsanalyse. Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und Stenosen >50% bei Männern, die keinen Diabetes mellitus aufwiesen und keinen Nikotinabusus aufwiesen

Die Regressionsanalyse zeigt eine positive Assoziation des D-Allels mit dem Auftreten von Stenosen der A. carotis bei Männern, die keinen Diabetes mellitus aufwiesen und keinen Nikotinabusus aufwiesen. Dabei war das Risiko bei heterozygoten D-Allel-Trägern um das 1,2fache und bei homozygoten D-Allel-Trägern um das 2,9fache erhöht.

#### **4. Diskussion**

SHIP ist eine populationsbezogene Studie im Nordosten Deutschlands, die breitgefächert verschiedene Krankheiten und Risikofaktoren untersucht. Die Studie wurde nach der deutschen Wiedervereinigung durchgeführt und berücksichtigt spezifische Situationen von Menschen in einer Phase, die ökonomische, politische und soziale Änderungen bedingte. Gekennzeichnet ist diese Phase durch Umstellungen der Lebensgewohnheiten, z.B. durch die Entwicklung einer Konsumgesellschaft, durch Umstellungen des Gesundheitssystems wie Einführung des Krankenkassensystems, das Fehlen staatlicher Kontrollen bei Vorsorgeuntersuchungen, aber auch von geänderten Arbeitsbedingungen wie Arbeitslosigkeit und Änderungen des sozialen Status innerhalb der Gesellschaft durch eine Verschärfung der sozialen Disparität.

Vor dem Hintergrund, dass die Daten der ECTIM-Studie sowohl einen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der ACE-Aktivität im Plasma als auch zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten nachwiesen und anschließende kleinere Fall-Kontroll-Studien mit klinischen Endpunkten widersprüchliche Ergebnisse hervorgebracht hatten, war es das Ziel der vorliegende Studie, eine Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der Intima-Media-Dicke in der A. carotis als einen Surrogatparameter für generalisierte subklinische atherosklerotische Gefäßwandläsionen nachzuweisen. Zum Zeitpunkt, als die Analyse der SHIP-Daten geplant wurde, lagen noch keine Ergebnisse einer großen bevölkerungsbasierten Studie vor.

In der Gesamtstudienpopulation der SHIP-Studie konnte allerdings keine Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der mittleren IMT der A. carotis communis nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des ACE-Gens und den subklinischen Endpunkten fokale atherosklerotische Plaques in der A. carotis bzw. Stenosen der A. carotis interna sowie den klinischen Endpunkten Prävalenz

von Schlaganfällen, Herzinfarkten, Angina pectoris oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit festgestellt werden.

Die Ergebnisse der SHIP-Studie stehen somit im Einklang mit vier weiteren inzwischen publizierten großen epidemiologischen Studien, die ebenfalls keine Assoziation zwischen dem ACE-Genpolymorphismus und der IMT bzw. atherosklerotischen Plaques der A. carotis nachweisen konnten (ARIC/NHLBI-Studie, ARNETT et al. 1998; Perth Risk Factor Prevalence Survey, HUNG et al. 1999; Suita-Studie, MANNAMI et al. 2001; Rotterdam Studie, SAYED-TABATABAEI et al. 2004). Somit konnten nun in insgesamt fünf bevölkerungsbasierten Studien aus zwei mitteleuropäischen, einer nordamerikanischen, einer australischen und einer asiatischen Bevölkerung kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des ACE-Gens und subklinischen atherosklerotischen Gefäßläsionen festgestellt werden. Die Stichprobengröße der in der SHIP-Kohorte mittels Carotis-Sonographie untersuchten Probanden ist mit 2437 deutlich größer als die Stichprobengröße der ARIC/NHLBI-Studie (700 Probanden) bzw. des Perth Risk Factor Prevalence Survey (1106 Teilnehmer), so dass SHIP im Vergleich zu diesen beiden Studien eine größere statistische Trennschärfe aufweist, um auch kleine Unterschiede nachweisen zu können. Zwar waren die Suita-Studie mit 4031 Teilnehmern und die Rotterdam Studie mit 5321 Teilnehmern im Vergleich zu SHIP noch größer angelegt, jedoch konnten auch hier keine Assoziationen zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der mittleren Carotis-IMT nachgewiesen werden.

Eine Meta-Analyse aller bis zum Jahr 2002 publizierten Studien, in die die Ergebnisse aus 17 Studien mit 9833 Teilnehmern eingingen, zeigt eine statistisch signifikante mittlere gewichtete Differenz der IMT von Teilnehmern mit dem DD- und II-Genotyp von 0,023 mm ( $p < 0,001$ ; SAYED-TABATABAEI et al. 2003). Nach Differenzierung in Populationen mit hohem und niedrigem Atherosklerose-Risiko beträgt die mittlere gewichtete Differenz der IMT bei Studien mit Populationen mit niedrigem Atherosklerose-Risiko lediglich 0,01 mm bei einem grenzwertigen Signifikanzniveau ( $p < 0,06$ ), während für Studien mit Hochrisiko-Populationen eine hochsignifikante Differenz von 0,074 mm ( $p < 0,002$ ) festzustellen war. Kritisch ist jedoch anzumerken, dass bei der

Analyse der Studien mit Populationen mit niedrigem Atherosklerose-Risiko mehr als die Hälfte der Daten aus Studien mit einer Teilnehmerzahl von weniger als 515 stammen. Gerade diese Studien mit geringer Teilnehmerzahl trugen wesentlich zu dem signifikanten Ergebnis bei, da diese größere Differenzen aufwiesen als die drei oben genannten populationsbasierten Studien. Insofern könnte das Ergebnis dieser Meta-Analyse durchaus durch einen „publication bias“, also dem bevorzugten Publizieren von positiven Ergebnissen bei Studien mit kleiner Fallzahl, beeinflusst worden sein, während negative Ergebnisse bei kleiner Fallzahl häufig nicht veröffentlicht werden. Außerdem wurde die Meta-Analyse vor der Publikation der ACE-Daten der Rotterdam Studie (SAYED-TABATABAEI et al. 2004) publiziert, die alleine schon mehr als halb so viele Teilnehmer einschloss als die gesamte Meta-Analyse und wahrscheinlich das Signifikanzniveau weiter gesenkt hätte. Die mittlere Differenz der IMT von Teilnehmern mit dem DD- und II-Genotyp in SHIP beträgt 0,002 mm bei Männern und 0,021 mm bei Frauen. Somit ist der Wert bei Männern vergleichbar mit den mittleren Differenzen des Perth Risk Factor Prevalence Survey und der Suita Studie (HUNG et al. 1999; MANNAMI et al. 2001).

Während die Meta-Analyse aus Studien mit der IMT als Studienendpunkt einen allenfalls schwachen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des DD-Genotyps und der IMT der A. carotis bei Individuen mit niedrigem Atherosklerose-Risiko festgestellt hat, scheint bei Individuen mit hohem Atherosklerose-Risiko ein deutlich stärkerer Zusammenhang zu bestehen (SAYED-TABATABAEI et al. 2003). Hier betrug die mittlere Differenz der IMT von Teilnehmern mit dem DD- und II-Genotyp 0,07 mm und war hochsignifikant. Auch hier ist jedoch einschränkend anzumerken, dass keine der berücksichtigten Studien mehr als 360 Teilnehmer aufwies, so dass auch hier ein „publication bias“ wahrscheinlich ist. Ähnlich verhält es sich bei den Meta-Analysen von Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten (OR 1,26 für das rezessive Modell; SAMANI et al. 1996) bzw. ischämischen Schlaganfällen (OR 1,31 für das rezessive Modell; SHARMA et al. 1998) und somit ebenfalls eine Selektion von Hochrisiko-Individuen, nämlich solchen mit bereits manifester Atherosklerose, untersuchten. Es ist naheliegend, dass diese Meta-

Analysen ebenfalls durch einen „publication bias“ beeinflusst wurden. In den genannten Meta-Analysen lagen die Odds-Ratios von Studien mit großer Fallzahl deutlich unter denen von Studien mit kleiner Fallzahl (SAMANI et al. 1996) bzw. es konnten in einer Meta-Analyse, die nur Studien mit großer Fallzahl berücksichtigte, keine signifikanten Assoziationen zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten mehr nachgewiesen werden (AGERHOLM-LARSEN et al. 2000). Andererseits sollten die negativen Ergebnisse nicht zu der Schlussfolgerung führen, dass das Renin-Angiotensin-System für die Entstehung und Progression von generalisierter Atherosklerose keine Rolle spielt. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, besteht eine ausreichende experimentelle und klinische Evidenz für ein wesentliches Mitwirken des Renin-Angiotensin-System bei der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der ACE I/D-Polymorphismus, möglicherweise über ein Kopplungs-Dysäquilibrium, die Enzymaktivität des zirkulierenden ACE determiniert (CAMBIEN et al. 1988, RIGAT et al. 1990, TIRET et al. 1992). Bei Teilnehmern des Perth Risk Factor Prevalence Survey bestand bei Trägern des Deletions-Polymorphismus eine im Mittel signifikant höhere Enzymaktivität des ACE (HUNG et al. 1999). Dennoch konnten bei Trägern des Deletions-Polymorphismus keine signifikant unterschiedliche IMT im Vergleich zu Trägern des Insertions-Polymorphismus festgestellt werden. Deshalb sind offenbar komplexere Pathomechanismen anzunehmen, die bisher nicht ausreichend erforscht sind. Außerdem scheint der genetische Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus auf die Genese atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen im Vergleich zu den traditionellen Gefäßrisikofaktoren eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang eines einzelnen Insertions/Deletions-Polymorphismus mit subklinischer Atherosklerose der A. carotis. Eine Vielzahl von Publikationen über Zusammenhänge einzelner Single Nucleotid Polymorphismen (SNP) oder Kopie-Varianten von a priori selektierten Kandidatengenen mit subklinischer oder manifester Atherosklerose haben bisher nicht wesentlich zur Erklärung von Gefäßerkrankungen beigetragen

(DICHGANS et al. 2005, HEGELE et al. 2007). Eine andere Herangehensweise liegt in der Untersuchung von Kombinationen verschiedener Risikogene, die offenbar einen stärkeren Zusammenhang bewirken als ein einzelner SNP allein (SZOLONKI et al. 2002, YAMASAKI et al. 2006). Ein weiteres Prinzip stellen die seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms zunehmend durchgeführten genomweiten Assoziationen mit bestimmten, klar definierten Phänotypen dar. Hierbei werden bis zu einer Million SNPs ausgewählt, die gleichmäßig über das Genom verteilt sind und nicht aufgrund einer bestimmten Funktion oder eines bestimmten Lokus innerhalb eines Gens ausgewählt wurden. Dadurch sollen Orte auf einem Chromosom identifiziert werden, an denen genetische Variationen wahrscheinlich sind. In einem zweiten Schritt sollen mittels DNA-Feinsequenzierung die für den entsprechenden Phänotyp kausative genetische Variation gefunden werden (DICHGANS et al. 2005). So wurden beispielsweise auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 mehrere SNPs identifiziert, die mit koronarer Herzkrankheit assoziiert sind. Allerdings hat dies noch nicht zur Identifizierung eines Gens geführt, da diese SNPs in keiner für ein bestimmtes Gen kodierenden Region lokalisiert sind, sondern im „Niemandland“ zwischen zwei benachbarten Genen zu finden sind (HELGADOTTIR et al. 2007, MCPHERSON et al. 2007). Ob sich dadurch genetische Determinanten subklinischer Atherosklerose oder Endorganschädigungen wie Myokard-Infarkt oder Schlaganfall identifizieren lassen, müssen weitere Studien in der Zukunft zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem zweiten Schritt explorative Subgruppenanalysen durchgeführt, um Hypothesen bezüglich potentieller Assoziationen von nach Risikofaktoren stratifizierten Subgruppen generieren zu können. Lediglich bei Nicht-Diabetikern und nichtrauchenden Männern konnte nach Adjustierung für das Alter, den systolischen Blutdruck sowie das LDL- und HDL-Cholesterin im Serum ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem D-Allel des ACE I/D-Polymorphismus und dem Vorhandensein von Carotisstenosen festgestellt werden. Das Risiko einer Carotisstenose stieg für heterozygote D-Allel-Träger 1,2fach und war für homozygote D-Allel-Träger fast 3fach erhöht.

In der restlichen Studienpopulation konnten keine weiteren signifikanten Assoziationen gefunden werden. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass traditionelle Risikofaktoren wie Diabetes mellitus und Nikotinabusus einen stärkeren Einfluss auf subklinische atherosklerotische Gefäßerkrankungen ausüben als der ACE I/D-Polymorphismus. Im Fall der vorliegenden Arbeit bestand ein solcher Zusammenhang allerdings nur für bereits weit fortgeschrittene Gefäßveränderungen.

Darüber hinaus wurde eine Analyse von Teilnehmern durchgeführt, die jünger als 55 Jahren waren, da zu vermuten ist, dass bei jüngeren Teilnehmern atherosklerotische Gefäßwandveränderungen noch keine wesentliche Rolle spielen und daher genetische Einflüsse möglicherweise eher nachweisbar sind. Allerdings zeigt auch diese Analyse keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ACE-Polymorphismus und der IMT der A. carotis interna. Lediglich bei jüngeren Frauen mit dem homozygoten DD-Genotyp wurden Plaques in der A. carotis häufiger festgestellt als bei denen mit homozygotem II-Genotyp. Allerdings erreichten die Unterschiede nur ein grenzwertiges Signifikanzniveau. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Cardiovascular Risk in Young Finns Study, einer Studie an 224 jungen Erwachsenen mit einem Alter zwischen 24 und 39 Jahren, die ebenfalls keine signifikante Assoziation nachweisen konnte (ISLAM et al. 2006). Ebenso konnte in einer Studie an 58 Nachfahren (Alter zwischen 8 und 34 Jahre), deren Eltern im Alter von unter 45 Jahren eine zerebrale Ischämie erlitten hatten, im Vergleich zu Kontroll-Personen mit der gleichen Altersverteilung, deren Eltern keine zerebrovaskuläre Ereignisse aufwiesen, kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ACE-Polymorphismus und der IMT der A. carotis festgestellt werden (VARDA et al. 2005).

Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Anzahl der Probanden in den Subgruppen sehr gering ist. Diese Subgruppenanalysen sind daher als explorative Pilotstudien zu verstehen, deren Ziel es ist, Hypothesen zu formulieren. Sie sind aufgrund nicht ausreichender statistischer Trennschärfe (so genannte statistische Power) nicht geeignet, potentielle Assoziationen zu überprüfen. Im Hinblick auf den explorativen Charakter der



Subgruppenanalysen wurde auf eine Bonferroni-Korrektur für multiple statistische Vergleiche verzichtet.

Eine wesentliche Stärke der Arbeit ist der Aufbau der Studie. Es wurde eine große, randomisiert selektierte populations-basierte Stichprobe untersucht, die eine ausgeglichene Verteilung bezüglich des Geschlechts und des Alters gewährleistet. Sie verfügt über eine weite Altersspanne (45 – 80 Jahre) und weist eine gleiche Anzahl von Probanden in jeder Altersgruppe auf. Die Häufigkeitsverteilung von Deletions- und Insertions-Polymorphismus-Trägern entspricht dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Zu den weiteren Stärken der Arbeit zählt die hohe Standardisierung und Validisierung der untersuchten Parameter, insbesondere der Ultraschalluntersuchungen der A. carotis, die nur von trainierten und regelmäßig zertifizierten Untersuchern und Auswertern durchgeführt wurden.

Zu den Limitierungen der vorliegenden Arbeit gehört jedoch, dass die Messungen der IMT auf die sondenferne Wand der A. carotis communis beschränkt wurden. Dadurch weicht die Methode der Messung von den Protokollen der ARIC/NHLBI-Studie, bei der die sondenferne Wand von A. carotis communis, interna und des Bulbus caroticus untersucht wurden (ARNETT et al. 1998) ab. Sie weicht auch von der Suita-Studie ab, bei der die sondenferne und die sondennahe Wand der A. carotis communis gemessen wurde (MANNAMI et al. 2001). Demgegenüber wurde in der Perth Risk Factor Prevalence Survey ein mit SHIP vergleichbares Messprotokoll verwendet (HUNG et al. 1999). Der Nachteil einer auf die sondenferne Wand der A. carotis communis beschränkte IMT-Messung ist, dass atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand im Bereich der Carotisbifurkation stärker ausgeprägt sind als in der A. carotis communis und dass die maximale IMT helikal verteilt ist (BÜRRIG et al. 1988). So hätte eine Miterfassung der sondennahen Wand und eine Ausdehnung der Messung auf die Carotisbifurkation möglicherweise frühere Manifestationsstadien erfassen können. Andererseits ist die alleinige Messung der IMT der sondenfernen Wand der A. carotis communis in mehreren wissenschaftlichen Studien als Prädiktor

zerebro- und kardiovaskulärer Erkrankungen ausreichend validiert (LORENZ et al. 2007). Die Entscheidung der SHIP-Untersucher, die Messung der IMT auf die sondenferne Wand der A. carotis communis zu beschränken, ist durch die bessere Reproduzierbarkeit und die erheblich geringere Untersuchungszeit im Vergleich zur Messung der sondennahen und sondenfernen Wand dreier arterieller Segmente (A. carotis communis und interna sowie des Carotis-Bulbus) begründet. Insbesondere die kürzere Untersuchungszeit ist in Anbetracht der Vielfalt der Untersuchungen, denen sich die SHIP-Probanden unterziehen müssen, um den Gesundheitszustand möglichst vieler Organsysteme zu erfassen, und im Hinblick auf die Belastbarkeit der Probanden sowie auf ökonomische Erwägungen das entscheidende Argument. Eine weitere Schwäche der Arbeit liegt in dem lediglich qualitativ erbrachten Nachweis von atherosklerotischen Plaques oder Stenosen der A. carotis im Sinne eines Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Plaques bzw. Stenosen. Eine quantitative Messung der Plaque-Dicke bzw. des Plaque-Volumens wäre wünschenswert, allerdings steht hierfür kein standardisiertes Messverfahren mit ausreichender Reproduzierbarkeit und Validität zur Verfügung. Eine Ausweitung der Untersuchung auf die A. carotis interna bzw. der Carotisbifurkation gemäß dem Protokoll der ARIC-Studie (THE ARIC INVESTIGATORS 1989, HEISS et al. 1991) oder der CHS-Studie (O'LEARY et al. 1991), die Plaques in die Messung der IMT einbezogen haben, sofern sich die Lumen-Intima-Grenzfläche durch eine klare und scharf abgrenzbare Linie darstellen lässt, hätte die Untersuchungszeit verlängert. Zum anderen hätte es die Gefahr beinhaltet, durch nicht messbare IMT bei Plaques mit irregulärer Oberfläche oder Mineralisierungen zu falsch niedrigen IMT-Werten zu führen. Eine dreidimensionale Rekonstruktion der Plaques ist technisch noch im Experimentalstadium und aufgrund eines erheblichen zeitlichen Aufwandes bezüglich der Daten-Akquisition und des Daten-Postprocessing für epidemiologische Studien nicht geeignet (SCHMINKE et al. 2001). Ein Anhalt für die Größe der atherosklerotischen Plaques kann in der SHIP-Studie lediglich über die Aussage einer Stenosierung des Gefäßlumens über 50% gemäß cw-Doppler Kriterien (VON BÜDINGEN und

VON REUTERN 1993) gewonnen werden. Doch auch hier besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Plaque-Größe und dem Grad der Stenosierung. Eine Ursache dafür ist, dass der Stenosegrad nicht nur von der Größe der atherosklerotischen Plaque, sondern auch vom Ausmaß des so genannten arteriellen Remodelling, also der Dilatationsfähigkeit der Arterie bei atherosklerotischen Erkrankungen, abhängt (GLAGOV et al. 1987). So könnte bereits eine kleine Plaque bei fehlender kompensatorischer Dilatation zu einer hämodynamisch relevanten Stenose führen, während bei ausreichender kompensatorischer Dilatation auch größere Plaques nicht zu einer Verminderung des freien Lumens führen.

Eine weitere Einschränkung der vorliegenden Arbeit ist die fehlende Messung der ACE-Aktivität im Serum und die fehlende Adjustierung der Messungen nach einer medikamentösen antihypertensiven Therapie. Insbesondere die Einnahme von ACE-Hemmern hätte eine genetisch bedingte erhöhte ACE-Aktivität im Serum und im Gewebe ausgleichen können.

## 5. Zusammenfassung

Vaskuläre Erkrankungen stellen in Deutschland und in anderen industrialisierten Ländern die häufigsten Todesursachen dar. Neben traditionellen Risikofaktoren der Atherosklerose wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Nikotinabusus, rückten in den vergangenen Jahren zunehmend genetische Faktoren der Atherosklerose in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Pathophysiologisch spielt das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. Neben dem zirkulierenden RAS existiert auch ein gewebeständiges, lokales RAS, wobei Angiotensin II in glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation von Protoonkogenen und Adhäsionsmolekülen induziert. Weiterhin ist es an der Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten in der Gefäßwand beteiligt und beschleunigt die Aufnahme von Lipiden und deren Oxidation, welche wiederum die Ursache für oxidativen Stress darstellt. Die Aktivität des zirkulierenden und wahrscheinlich auch des gewebsständigen ACE steht unter einer deutlichen genetischen Kontrolle. Dabei variiert die Enzymaktivität zwischen den einzelnen Genotypen um den Faktor 20 bis 40. Das menschliche ACE-Gen ist auf Chromosom 17q23 lokalisiert und weist einen Insertions/Deletions-Polymorphismus auf. Dieser ist durch die An- bzw. Abwesenheit eines 250 bp-Fragments im Intron 16 des ACE-Gens charakterisiert und kann kodominant folgende Genotypen bedingen: DD (homozygot, Deletion), ID (heterozygot, Deletion und Insertion) und II (homozygot, Insertion).

Das Design der vorliegenden Arbeit wurde vor dem Hintergrund entwickelt, dass in der ECTIM (Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde)-Studie erstmals an 610 Patienten mit Myokardinfarkten und 733 Kontrollen sowohl ein Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der ACE-Aktivität im Plasma als auch zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten festgestellt wurde. Zudem brachten anschließende kleinere Fall-Kontroll-Studien mit klinischen Endpunkten widersprüchliche Ergebnisse

hervor. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob in der Basisstudie der Study of Health in Pomerania (SHIP-0), einer populationsbezogenen Querschnittsstudie im Nordosten Deutschlands, eine Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und atherosklerotischen Gefäßwandläsionen besteht. Hierzu wurden sowohl subklinische Risikomarker wie die Intima-Media-Dicke (IMT) in der A. carotis als auch manifeste atherosklerotische Veränderungen wie Plaques und Stenosen untersucht.

Von den 4310 Teilnehmern der SHIP-0-Studie wurde bei 4262 Personen (98,9%) der ACE-Polymorphismus bestimmt. Lediglich bei 48 Personen liegen keine Daten bezüglich der genetischen Untersuchung vor. Die gentechnische Analyse der DNA ergab, dass 1031 Personen (23,9%) den Genotyp II besitzen, 2131 Personen (49,4%) haben den Genotyp ID und 1100 (25,5%) der Untersuchten zeigen den Genotyp DD.

Insgesamt konnten in der Gesamtpopulation keine signifikanten Assoziationen zwischen dem ACE-Polymorphismus und der IMT nachgewiesen werden. Es fanden sich ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus und klinischen Endpunkten wie vaskulären Erkrankungen.

In einem weiteren Schritt der Studie wurden Subgruppenanalysen durchgeführt. Ausgeschlossen wurden Diabetiker und Raucher, um zu verhindern, dass diese Risikofaktoren der Atherosklerose den Effekt des ACE-Polymorphismus maskieren. Dabei zeigte sich, dass Stenosen der A. carotis (> 50%) bei männlichen Teilnehmern mit dem DD-Genotyp signifikant häufiger nachweisbar waren als bei Teilnehmern mit dem II-Genotyp. Die Regressionsanalyse in dieser Subgruppe zeigte eine positive Assoziation zwischen dem D-Allel und dem Auftreten von Stenosen der A. carotis, mit einem 2,9fach (homozygote D-Allel-Träger) bzw. 1,2fach (heterozygote D-Allel-Träger) erhöhtem Risiko. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass diese Subgruppenanalysen als explorative Pilotstudien zu verstehen sind, die das Ziel besitzen, Hypothesen zu formulieren. Sie sind aufgrund nicht ausreichender statistischer Trennschärfe

(so genannte statistische Power) nicht geeignet, potentielle Assoziationen zu überprüfen.

Die Ergebnisse der SHIP-Studie stehen somit im Einklang mit vier weiteren mittlerweile publizierten großen epidemiologischen Studien, die ebenfalls keine Assoziationen zwischen dem ACE-Genpolymorphismus und der IMT bzw. atherosklerotischen Plaques der A. carotis nachweisen konnten. Dennoch scheint eine, allerdings nur schwache Assoziation zwischen dem homozygoten DD-Genotyp des ACE-Polymorphismus und subklinischen atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen zu bestehen, die ähnlich der Assoziation zwischen ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten bzw. ischämischen Schlaganfällen nur in Meta-Analysen nachgewiesen werden kann.

## 6. Thesen

1. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose.
2. Neben dem zirkulierenden RAS existiert auch ein gewebeständiges, lokales RAS, wobei Angiotensin II in glatten Gefäßmuskelzellen eine Stimulation von Protoonkogenen und Adhäsionsmolekülen induziert. Weiterhin ist es an der Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten in der Gefäßwand beteiligt und beschleunigt die Aufnahme von Lipiden und deren Oxidation, in deren Folge oxidativer Stress entsteht.
3. Die Aktivität des zirkulierenden und wahrscheinlich auch des gewebsständigen ACE steht unter einer deutlichen genetischen Kontrolle mit einer Variation der Enzymaktivität zwischen den einzelnen Genotypen um den Faktor 20 bis 40.
4. Das menschliche ACE-Gen ist auf Chromosom 17q23 lokalisiert und weist einen Insertions/Deletions(I/D)-Polymorphismus auf, der durch die An- bzw. Abwesenheit eines 250 bp-Fragments im Intron 16 des ACE-Gens charakterisiert ist. Er kann kodominant folgende Genotypen bedingen: DD (homozygot, Deletion), ID (heterozygot, Deletion und Insertion) und II (homozygot, Insertion).
5. Eine Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und dem Auftreten von Herzinfarkten wurde erstmals in der ECTIM (Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde)-Studie an 610 Patienten mit Myokardinfarkten und 733 Kontrollen nachgewiesen. Dabei war der DD-Genotyp mit einem 1,34fach erhöhten Risiko mit dem Auftreten von Myokardinfarkten assoziiert.
6. Das Design der vorliegenden Arbeit wurde vor dem Hintergrund entwickelt, dass die Daten der ECTIM-Studie sowohl einen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der ACE-Aktivität im Plasma als auch zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten nachgewiesen hatten und anschließende kleinere

Fall-Kontroll-Studien mit klinischen Endpunkten widersprüchliche Ergebnisse hervorbrachten.

7. Während ältere bevölkerungsbasierte epidemiologische Studien zumeist Assoziationen mit klinischen Endpunkten wie Mortalität oder Morbidität, d. h. dem Auftreten oder Ausbleiben klinischer Ereignisse wie Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit oder Hirninfarkt untersuchten, die zudem nur bei relativ wenigen Individuen der untersuchten Bevölkerungsstichprobe auftraten, verwenden neuere epidemiologische Studien häufig Surrogatparameter wie die Intima-Media-Dicke (Intima-Media-Thickness, IMT) der A. carotis.
8. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung einer Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der Intima-Media-Dicke in der A. carotis als einen Surrogatparameter für generalisierte subklinische atherosklerotische Gefäßwandläsionen. Analysiert wurden dazu Daten der Basisstudie der „Study of Health in Pomerania“ (SHIP-0), einer bevölkerungsbasierten epidemiologischen Querschnittsstudie in der Region Vorpommern im Nordosten Deutschlands.
9. SHIP-0 ist eine epidemiologische Untersuchung im Rahmen des Forschungsverbundes „Community Medicine“ an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Diese besitzt das Ziel, die Häufigkeiten und die Verteilung von relevanten Erkrankungen wie Herz-Kreislaufenerkrankungen, neurologische Erkrankungen, Diabetes mellitus, Erkrankungen des Zahn- und Kauapparates, von potentiellen Risikofaktoren sowie von Lebensstilfaktoren und sozioökonomischen Faktoren regional zu erfassen.
10. Zur Analyse subklinischer atherosklerotischer Gefäßveränderungen wurden als abhängige Variablen IMT, Plaques und Stenosen > 50% gewählt.
11. Von den 4310 Teilnehmern der SHIP-0-Studie wurde bei 4262 Personen (98,9%) der ACE-Polymorphismus bestimmt. Lediglich bei 48 Personen liegen keine Daten bezüglich der genetischen Untersuchung vor.



12. Die gentechnische Analyse der DNA ergab, dass 1031 Personen (23,9%) den Genotyp II besitzen, 2131 Personen (49,4%) haben den Genotyp ID und 1100 (25,5%) der Untersuchten zeigen den Genotyp DD. Dies entspricht einer Verteilung der Genotypen von 1:2:1 und damit den Erwartungen bei einer Verteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.
13. In der Gesamtstudienpopulation der SHIP-Studie konnte keine Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und der mittleren IMT der A. carotis communis nachgewiesen werden.
14. Darüber hinaus konnte ebenfalls keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus des ACE-Gens und den subklinischen Endpunkten fokale atherosklerotische Plaques in der A. carotis bzw. Stenosen der A. carotis interna sowie den klinischen Endpunkten Prävalenz von Schlaganfällen, Herzinfarkten, Angina pectoris oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit festgestellt werden.
15. In explorativen Subgruppenanalysen wurde lediglich bei Nicht-Diabetikern und nichtrauchenden Männern nach Adjustierung für das Alter, den systolischen Blutdruck sowie für das LDL- und HDL-Cholesterin im Serum ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem D-Allel des ACE I/D-Polymorphismus und dem Vorhandensein von Carotisstenosen festgestellt. Dabei war das Risiko einer Carotisstenose für heterozygote D-Allel-Träger 1,2fach und für homozygote D-Allel-Träger fast 3fach erhöht.
16. Diese Subgruppenanalysen sind daher als explorative Pilotstudien zu verstehen, deren Ziel es ist, Hypothesen zu formulieren. Sie sind aufgrund nicht ausreichender statistischer Trennschärfe (so genannte statistische Power) nicht geeignet, potentielle Assoziationen zu überprüfen.
17. Die Ergebnisse der SHIP-Studie stehen somit im Einklang mit vier weiteren mittlerweile publizierten großen epidemiologischen Studien, die ebenfalls keine Assoziation zwischen dem ACE-Genpolymorphismus und der IMT bzw. atherosklerotischen Plaques der A. carotis nachweisen konnten.

18. Dennoch scheint eine, allerdings nur schwache Assoziation zwischen dem homozygoten DD-Genotyp des ACE-Polymorphismus und subklinischen atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen zu bestehen, die ähnlich der Assoziation zwischen dem ACE I/D-Polymorphismus und Myokardinfarkten bzw. ischämischen Schlaganfällen nur in Meta-Analysen nachgewiesen werden kann.
19. Der genetische Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus auf die Genese atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen spielt im Vergleich zu den traditionellen Gefäßrisikofaktoren eine eher untergeordnete Rolle.
20. Zu den Stärken der Arbeit zählt der Studienaufbau. Es wurde eine große randomisiert selektierte populations-basierte Stichprobe untersucht, die eine ausgeglichene Verteilung bezüglich des Geschlechts und des Alters gewährleistet. Sie verfügt über eine weite Altersspanne (45–80 Jahre) und weist eine gleiche Anzahl von Probanden in jeder Altersgruppe auf.
21. Zu den Limitierungen der vorliegenden Arbeit gehören die fehlende Messung der ACE-Aktivität im Serum und die fehlende Adjustierung der Messungen nach einer medikamentösen antihypertensiven Therapie, insbesondere der Einnahme von ACE-Hemmern, die eine genetisch bedingte erhöhte ACE-Aktivität im Serum und im Gewebe hätte ausgleichen können.

## 7. Literatur

AGERHOLM-LARSEN B, NORDESTGAARD BG, STEFFENSEN R, SØRENSEN TIA, JENSEN G, TYBJÆRG-HANSEN A:

ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10,150 individuals: a case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study.

Circulation 1997a;95:2358–2367

AGERHOLM-LARSEN B, NORDESTGAARD BG, TYBJÆRG-HANSEN A:

ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20(2):484–492

AGERHOLM-LARSEN B, TYBJÆRG-HANSEN A, FRIKKE-SCHMIDT R, GRØNHOLDT M-LM, JENSEN G, NORDESTGAARD BG:

ACE gene polymorphism as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease.

Ann Intern Med 1997b;127:346–355

ANGELERI F, ANGELERI VA, FOSCHI N, GIAQUINTO S, NOLFE G:

The influence of depression, social activity, and family stress on functional outcome after stroke.

Stroke 1993;24(10):1478–1483

Anonymous:

The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration.

J Clin Epidemiol 1988;41:105–114

ARCA M, PANNITTERI G, CAMPAGNA F, CANDELORO A, MONTALI A, CANTINI R, SECCARECCIA F, CAMPA PP, MARINO B, RICCI G:

Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is not associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction in a sample of Italian patients.

Eur J Clin Invest 1998;28:485–490

ARIYARATNAM R, CASAS JP, WHITTAKER J, SMEETH L, HINGORAN AD, SHARMA P:

Genetics of ischaemic stroke among persons of non-european descent: a meta-analysis of eight genes involving ~32500 individuals.

PLOS med 2007;4(4):728–736

ARNETT DK, BORECKI IB, LUDWIG EH, PANKOW JS, MYERS R, EVANS G, FOLSOM AR, HEISS G, HIGGINS M:

Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme genotypes and carotid atherosclerosis: The atherosclerosis risk in communities and the NHLBI family heart studies.

Atherosclerosis 1998;138:111–116

BALLA T, BAUKAL AJ, ENG S, CATT KJ:

Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla.

Mol Pharmacol 1991;44(3):401–406

BARLEY J, BLACKWOOD A, CARTER ND, CREWS DE, CRUICKSHANK J:

Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism association with ethnic origin.

Hypertension 1994;12:955–957

BEDNARSKA-MAKARUK M, RODO M, MARKUSZEWSKI C, ROZENFELD A, SWIDERSKA M, HABRAT B, WEHR H:

Polymorphisms of apolipoprotein E and angiotensin-converting enzyme genes and carotid atherosclerosis in heavy drinkers.

Alcohol Alcohol 2005;40(4):274–282

BEOHAR N, DAMARAJU S, PRATHER A, YU QT, RAIZNER A, KLEIMAN NS, ROBERTS R, MARIAN AJ:

Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease.

J Investig Med 1995;43:275–280

BERK BC, VEKSHTEIN V, GORDON HM, TSUDA T:

Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.

Hypertension 1989;13:305–314

BLOEM LJ, MANATUNGA AK, PRATT JH:

Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity.

Hypertension 1996;27(1):62–66

BOCKXMEER FM, MAMOTTE CDS, GIBBONS FA, BURKE V, TAYLOR RR:

Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary angioplasty.

Circulation 1995;92:2066–2071

BOHN M, BERGE KE, BAKKEN A, ERIKSEN J, BERG K:

Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction.

Clin Genet 1993;44:292–297

BOND MG, BARNES RW, RILEY WA, WILMOTH SK, CHAMBLESS LE, HOWARD G, OWENS B:  
High-resolution B-mode ultrasound scanning methods in the Atherosclerosis  
Risk in Communities Study (ARIC).

J Neuroimag 1991;1:68–73

BONITHON-KOPP C, DUCIMETIERE P, TOUBOUL PJ, FEVE JM, BILLAUD E, COURBON D,  
HERAUD V:

Plasma angiotensin-converting enzyme activity and carotid wall thickening.

Circulation 1994;89:952–954

BOTS ML, HOES AW, KOUDSTAAL PJ, HOFMAN A, GROBBEE DE:

Common Carotid Intima-Media Thickness and Risk of Stroke and Myocardial  
Infarction, The Rotterdam Study.

Circulation 1997;96:1432–1437

BOTS ML, HOFMAN A, GROBBEE DE:

Common Carotid Intima-Media Thickness and lower extremity arterial  
atherosclerosis. The Rotterdam Study.

Arterioscler Thromb 1994;14:1885–1891

BRAUNWALD E:

Pathophysiology of heart failure.

In: Braunwald E, ed. Heart disease. Philadelphia; Saunders 1992:393–419

BURKE GL, EVANS GW, RILEY WA, SHARRETT AR, HOWARD G, BARNES RW, ROSAMOND  
W, CROW RS, RAUTAHARJU PM, HEISS G:

Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in  
middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.

Stroke 1995;26:386–391

BÜRRIG KF, HORT W:

Pathogenesis of carotid atherosclerosis.

In Hennerici M, Sitzer G, Weger HD, eds.

Carotid artery plaques. Munich: Karger, 1988:101–114

CAMBIEN F:

The angiotensin-converting enzyme (ACE) genetic polymorphism: its relationship with plasma ACE level and myocardial infarction.

Clin Genet 1994;46:94–101

CAMBIEN F, ALHENC-GELAS F, HERBETH B, ANDRE JL, RAKOTOVAO R, GONZALES MF, ALLEGRINI J, BLOCK C:

Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: The Nancy Study.

Am J Hum Genet 1988;43:774–780

CAMBIEN F, COSTEROUSSE O, TIRET L, POIRIER O, LECERF L, GONZALES MF, EVANS A, ARVEILER D, CAMBOU JP, LUC G, RAKOTOVAO R, DUCIMETIERE P, SOUBRIER F, ALHENC-GELAS F:

Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction.

Circulation 1994;90(2):669–676

CAMBIEN F, POIRIER O, LECERF L, EVANS A, CAMBOU J, ARVEILER D, LUC G, BARD JM, BARA L, RICARD S, TIRET L, AMOUYEL P, ALHENC-GELAS F, SOUBRIER F:

Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.

Nature 1992;359:641–644

CASAS JP, HINGORANI AD, BAUTISTA LE, SHARMA P:

Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18.000 cases and 58.000 controls.

Arch Neurol 2004;61(11):1652–1661

CASTELLANO M, MUISAN ML, RIZZONI D, BESCHI M, PASINI G, CINELLE A, SALVETTI M, PORTERI E, BETTONI G, KREUTZ R, LINDPAINTNER K, ROSEI EA:

Angiotensin-converting enzyme I/D-polymorphism and arterial wall thickness in a general population: the Vobarno study.

Circulation 1995;91:2721–2724

CATTO A, CARTER AM, BARRETT JH, STICKLAND M, BAMFORD J, DAVIES JA, GRANT PJ:

Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease.

Stroke 1996;27:435–440

CHAMBLESS LE, FOLSOM AR, CLEGG LX:

Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.

Am J Epidemiol 2000;151:478–487

CHAMBLESS LE, HEISS G, FOLSOM AR, ROSAMOND W, SZKLO M, SHARRETT AR, CLEGG LX:

Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993.

Am J Epidemiol 1997;146:483–494

CHRISTENSEN K:

Population Genetics.

[http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/\\_Popgen/genetics/genetik.htm](http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetics/genetik.htm) (30.12.2004)



DE GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T:

International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.

Parmacol Rev 2000;52(3):415–472

DESSI-FULGHERI P, CATALINI R, SARZANI R, STURBINI S, SIRAGUSA N, GUAZZAROTTI F, OFFIDANI M, TAMBURRINI P, ZINGARETTI O, RAPPELLI A:

Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and carotid atherosclerosis in a low-risk population.

Hypertension 1995;13:1593–1596

DICHGANS M, MARKUS HS:

Genetic association studies in stroke. Methodological issues and proposed standard criteria.

Stroke 20005;36:2027–2031

DÜSING R, MÜLLER U:

Blutdrucksenkung unter dem ACE-Hemmer Spirapil. „24-Hour Efficacy of Real once daily application of Spirapil“ (HERAS-Studie).

MMW Fortschr Med 2003;145(Suppl 3):77–80

EVANS AE, POIRIER O, KEE F, LECERF L, MCCRUM E, FALCONER T, CRANE J, O'ROURKE DF, CAMBIEN F:

Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease.

Q J Med 1994;87:211–214

FARBER HW, CENTER DM, ROUNDS S, DANILOV SM:

Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells.

Eur Heart J 1990;11(Suppl B):100–7

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS:

Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.

Clin Chem 1972;18:499–502

FRIEDL W, KREMPLER F, PAULWEBER B, PICHLER M, SANDHOFER F:

A deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene is not associated with coronary heart disease in an Austrian population.

Atherosclerosis 1995;112:137–143

FROST D, PFOHL M, CLEMENS P, HAERING HU, BEISCHER W:

Evaluation of the Insertion/Deletion ACE Gene Polymorphism as a Risk Factor for Carotid Artery Intima-Media Thickening and Hypertension in Young Type 1 Diabetic Patients.

Diab Care 1998;21:836–840

FUJISAWA T, IKEGAMI H, SHEN GQ, YAMATO E, TAKEKAWA K, NAKAGAWA Y, HAMADA Y, UEDA H, RAKUGI H, HIGAKI J, OHISHI M, FUJII K, FUKUDA M, OGIHARA T:

Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM.

Diab Care 1995;18:983–985

GARDEMANN A, WEIß T, SCHWARTZ O, EBERBACH A, KATZ N, HEHRLEIN FW, TILLMANN H, WAAS W, HABERBOSCH W:

Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients.

Circulation 1995;92:2796–2799

GIBBONS GH:

Vasculoprotective and cardioprotective mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibition: the homeostatic balance between angiotensin II and nitric oxide.

Clin Cardiol 1997;20(Suppl II):II-18-25

GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS CK, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS GJ:

Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.

N Eng J Med 1987;316(22):1371-5

GORMLEY K, BEVAN S, MARKUS HS:

Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin system and cerebral small vessel disease.

Cerebovasc Dis 2007;23:148-155

GREENLAND P, ABRAMS J, AURIGEMMA GP, BOND MG, CLARK LT, CRIQUI MH, CROUSE JR, FRIEDMAN L, FUSTER V, HERRINGTON DM, KULLER LH, RIDKER PM, ROBERTS WC, STANFORD W, STONE N, SWAN HJ, TAUBERT KA, WEXLER L:

Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: non-invasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III.

Circulation 2000;101:E16-E22

HEGELE RA, DICHGANS M:

Update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2007.

Stroke 2008;39:252-254

HEISS G, SHARRETT AR, BARNES R, CHAMBLESS LE, SZKLO M, ALZOLA C AND THE ARIC INVESTIGATORS:

Carotid atherosclerosis measured by B-Mode ultrasound in populations:

Associations with cardiovascular risk factors in the ARIC Study.

Am J Epidemiol 1991;134:250-260

HELGADOTTIR A, THORLEIFSSON G, MANOLESCU A, GRETARSDOTTIR S, BLONDAL T, JONASDOTTIR A, JONASDOTTIR A, SIGURDSSON A, BAKER A, PALSSON A, MASSON G, GUDBJARTSSON DF, MAGNUSSON KP, ANDERSEN K, LEVEY AI, BACKMAN VM, MATTHIASDOTTIR S, JONSDOTTIR T, PALSSON S, EINARSDOTTIR H, GUNNARSDOTTIR S, GYLFASON A, VACCARINO V, HOOPER WC, REILLY MP, GRANGER CB, AUSTIN H, RADER DJ, SHAH SH, QUYYUMI AA, GULCHER JR, THORGEIRSSON G, THORSTEINSDOTTIR U, KONG A, STEFANSSON K:

A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction.

Science 2007;316:1491–1493

HERMANN FH, GRIMM R, SCHUSTER G, SELCHOW B, BRÖSER M, SCHRÖDER W:

Teilvorhaben 02. Molekulargenetische Epidemiologie und ursachenorientierte Analyse der dominanten Faktor V Leiden-Mutation, der rezessiven CFTR-Genmutation und des ACE-Genpolymorphismus als Risikofaktoren für den Gesundheitszustand einer bevölkerungsrepräsentativen Stichprobe aus Vorpommern.

Abschlußbericht. Berichtszeitraum 16.10.1997 bis 19.05.2001:2–3

HOLYCROSS BJ, PEACH MJ, OWENS GK:

Angiotensin II stimulates increased protein synthesis, not increased DNA synthesis, in intact rat aortic segments, in vitro.

J Vasc Res 1993;30:80–86

HOSOI M, NISHIZAWA Y, KOGAWA K, KAWAGISHI T, KONISHI T, MAEKAWA K, EMOTO M, FUKUMOTO S, SHIOI A, SHOJI T, INABA M, OKUNO Y, MORII H:

Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with carotid arterial wall thickness in non-insulin-dependent diabetic patients.

Circulation 1996;94:704–707

HOWARD G, MANOLIO TA, BURKE GL, WOLFSON SK, O'LEARY DH:

Does the association of the risk factors and atherosclerosis change with age?

An analysis of the combined ARIC and CHS cohorts. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) and Cardiovascular Health Study (CHS) investigators.

Stroke 1997;28:1693–1701

HUMPHRIES SE, MORGAN L:

Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches.

Lancet Neurology 2004;3:227–235

HUNG J, MCQUILLAN BM, NIDORF M, THOMPSON PL, BEILBY JP:

Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1969–1974

INSULL W JR., BOND MG, WILMOTH S, FISHEL J, HERSON J:

Ultrasound lesions of the carotid artery and risk factors in men.

In: S Glagov, Newman WP III, Schaffer SA: Pathobiology of the human Atherosclerotic Plaque. Springer, New York, 1990:663–669

ISLAM MS, LEHTIMÄKI T, JUONALA M, KÄHÖNEN M, HUTRI-KÄHÖNEN N, KAINULAINEN K, MIETTINEN H, TAITTONEN L, KONTULA K, VIKARI JS, RAITAKARI OT:

Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensinogen (AGT) genes and their associations with blood pressure and carotid artery intima media thickness among healthy Finnish young adults--the Cardiovascular Risk in Young Finns Study.

Atherosclerosis 2006;188:316–322

JOHANNING GL, JOHNSTON KE, TAMURA T, GOLDENBERG RL:

Ethnic differences in angiotensin converting enzyme gene Polymorphism.

Hypertension 1995;13:710–711

JOHN U, GREINER B, HENSEL E, LÜDEMANN J, PIEK M, SAUER S, ADAM C, BORN G, ALTE D, GREISER E, HAERTEL U, HENSE HW, HAERTING J, WILlich S, KESSLER C:  
Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design.  
Soz Praeventivmed 2001;46:186–194

KAMITANI A, RAKUGI H, HIGAKI J, OHISHI M, SHI SJ, TAKAMI S, NAKATA Y, HIGASHINO Y, FUJII K, MIKAMI H:  
Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis.  
Hypertension 1995;25:950–953

KANNELL WB, NEATON JD, WENTWORTH D:  
Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial.  
Am Heart J 1986;112:825–836

KARIO K, KANAI N, SAITO K, NAGO N, MATSUO T, SHIMADA K:  
Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensive.  
Circulation 1996;93:1630–1633

KATO H, SUZUKI H, TAJIMA S, OGOTA Y, TOMINAGA T, SATO A, SARUTA T:  
Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.  
Hypertension 1991;9:17–22

KATSUYA T, KOIKE G, YEE TW, SHARPE N, JACKSON R, NORTON R, HORIUCHI M, PRATT RE, DZAU VJ, MACMAHON S:

Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease.

Lancet 1995;345:1600–1603

KAUMA H, PÄIVÄNSALO M, SAVOLAINEN MJ, RANTALA AO, KIEMA TR, LILJA M, REUNANEN A, KESÄNIEMI YA:

Association between angiotensin converting gene polymorphism and carotid atherosclerosis.

Hypertension 1996;14:1183–1187

KEAVNEY BD, DUDLEY CRK, STRATTON IM, HOLMAN RR, MATHEWS DR, RATCLIFFE PJ, TURNER RC:

Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction in NIDDM.

Diabetologia 1995;38:948–952

KEIDAR S, KAPLAN M, SHAPIRA C, BROOK JG, AVIRAM M:

Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II.

Atherosclerosis 1994;107:71–84

KEIL U, CAIRNS V, DÖRING A :

MONICA Project, Region Augsburg,

Manual of Operations.GSF-Bericht 20. München:1985.

KOSTULAS K, HUANG WX, CRISBY M, JIN YP, LANNFELT L, EGGERTSEN G, KOSTULAS V, HILLERT J:

An angiotensin-converting enzyme gene polymorphism suggests a genetic distinction between ischaemic stroke and carotid stenosis.

Eur J Clin Invest 1999;29:478–483

LEATHAM E, BARLEY J, REDWOOD S, HUSSEIN W, CARTER N, JEFFERY S, BATH PMW, CAMM A:

Angiotensin-I converting enzyme (ACE) polymorphism in patients presenting with myocardial infarction or unstable angina.

J Hum Hypertens 1994;8:635–638

LINDPAINNER K, JIN M, NIEDERMAIER N, WILHELM MJ, GANTEN D:

Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart.

Circulation Research 1990;67:564–573

LINDPAINNER K, PFEFFER MA, KREUTZ R, STAMPFER J, GRODSTEIN F, LAMOTTE F, BURING J, HENNEKENS CH:

A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease.

N Engl J Med 1995;332:706–711

LUDWIG E, CORNELI PS, ANDERSON JL, MARSHALL HW, LALOUEL JM, WARD RH:

Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis.

Circulation 1995;91:2120–2124

LORENZ MW, MARKUS HS, BOTS ML, ROSVALL M, SITZER M:

Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness. A systematic review and meta-analysis.

Circulation 2007;115:459–467



LÜDEMANN J, PIEK M, WOOD WG, MEYER S, GREINER B, JOHN U, HENSE HW:  
Methoden zur Qualitätssicherung im medizinischen Untersuchungsbereich  
epidemiologischer Feldstudien: Die "Study of Health in Pomerania" (SHIP).  
Gesundheitswesen 2000;62:234–243

MANNAMI T, KATSUYA T, BABA S, INAMOTO N, ISHIKAWA K, HIGAKI J, OGIHARA T,  
OGATA J:  
Low potentiality of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion  
polymorphism as a useful predictive marker for carotid atherogenesis in a large  
general population of a Japanese city: the Suita study.  
Stroke 2001;32(6):1250–6

MARGAGLIONE M, CELENTANO E, GRANDONE E, VECCHIONE G, CAPPUCCI G, GIULIANI N,  
COLAIZZO D, PANICO S, MANCINI FP, DI MINNO G:  
Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene in patients  
with a history of ischemic stroke.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;Feb;16(2):304–309

MARKUS HS, BARLEY J, LUNT R, BLAND JM, JEFFREY S, CARTER ND, BROWN MM:  
Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism.  
A new risk factor for lacunar stroke but not for carotid atheroma.  
Stroke 1995;26:1329–1333

MARKUS H, KAPOZSTA Z, DITRICH R, WOLFE C, ALI N, POWELL J, MENDELL M,  
CULLINANE M:  
Increased common carotid intima-media thickness in UK African Caribbeans and  
its relation to chronic inflammation and vascular candidate gene  
polymorphisms.  
Stroke 2001;32:2465–2471

MATSUSAKA T, ICHIKAWA I:

Biological functions of angiotensin and its receptors.

Annu Rev Physiol 1997;59:395–412

MATTU RK, NEEDHAM EWA, GALTON DJ, FRANGOS E, CLARK AJL, CAULFIELD M:

A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary heart disease in the Caerphilly Heart Study.

Circulation 1995;91:270–274

MCPHERSON R, PERTSEMLIDIS A, KAVASLAR N, STEWART A, ROBERTS R, COX DR, HINDS DA, PENNACCHIO LA, TYBJAERG-HANSEN A, FOLSOM AR, BOERWINKLE E, HOBBS HH, COHEN JC:

A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease.

Science 2007;316(5830):1488–1491

MERCURI M, TANG R, BOND MG:

Validity and reproducibility of B-mode ultrasound imaging in measuring arterial near wall.

Circulation 1991;84(Suppl II):II–541

MIETTINEN HE, KORPELA K, HAMALAINEN L, KONTULA K:

Polymorphisms of the apolipoprotein and angiotensin converting enzyme genes in young North Karelian patients with coronary heart disease.

Hum Genet 1994;94:189–192

MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF:

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic Acids Res 1988;16(3):1255

MÜLLER DN, LUFT FC:

The renin-angiotensin system in the vessel wall.

Basic Res Cardiol 1998;93(Suppl 2):7–4

NAKAI K, ITOH, C, MIURA Y, HOTTA K, MUSA T, ITOH T, MIYAKAWA T, IWASAKI R,  
HIRAMORI K :

Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese.

Circulation 1994;90:2199–2202

O´BRIEN E, MEE F, ATKINS N, THOMAS M:

Evaluation of three devices for self-measurement of blood pressure according to the revised British Hypertension Society Protocol: the Omron HEM-705CP, Philips HP5332, and Nissei DS-175.

Blood Press Monit 1996;1(1):55–61

ODAWARA M, MATSUNUMA A, YAMASHITA K:

Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance.

Hum Genet 1997;100:163–166

O´LEARY DH, POLAK JF, KRONMAL RA, KITTNER SJ, BOND MG, WOLFSON SK JR,  
BROMMER W, PROCE TR, GARDIN M, SAVAGE PJ:

Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group.

Stroke 1991;22(9),1155–1163

O´LEARY DH, POLAK JF, KRONMAL RA, MANOLIO TA, BURKE GL, WOLFSON SK:

Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults.

N Engl J Med 1999;340:14–22

O'LEARY DH, POLAK JF, KRONMAL RA, SAVAGE PJ, BORHANI NO, KITTNER SJ, TRACY R, GARDIN JM, PRICE TR, FURBERG CD:

Thickening of the carotid wall: a marker for atherosclerosis in the elderly?

Stroke 1996;27:224–231

PATEL MK, BETTERIDGE LJ, HUGHES AD, CLUNN GF, SCHACHTER M, SHAW R, SEVER PS:

Effect of angiotensin II on the expression of the early growth response gene c-fos and DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells.

Hypertension 1996;14:341–347

PERA J, SLOWIK A, DZIEDZIC T, WLOCH D, SZCZUDLIK A:

ACE I/D polymorphism in different etiologies of ischemic stroke.

Acta Neurol Scand 2006;114:320–322

PERSSON J, STAVENOW L, WIKSTRAND J, ISRAELSSON B, FORMGREN J, BERGLUND G:

Noninvasive quantification of atherosclerotic lesions. Reproducibility of ultrasonographic measurement of arterial wall thickness and plaque size.

Arterioscler Thromb 1992;12:261–266

PFOHL M, FETTER M, KOCH M, BARTH CM, WEIB R, HÄRING HU:

Association between angiotensin I-converting enzyme genotypes, extracranial artery stenosis, and stroke.

Atherosclerosis 1998;140:161–166

PIGNOLI P, TREMOLI E, POLI A, ORESTE P, PAOLETTI R:

Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging.

Circulation 1986;74:1399–1406

POLI A, TREMOLI E, COLOMBO A, SIRTORI M, PIGNOLI P, PAOLETTI R:  
Ultrasonographic measurement of the common carotid artery wall thickness in hypercholesterolemic patients.  
*Atherosclerosis* 1988;70:253–261

PUJIA A, MOTTI C, IRACE C, CORTESE C, BIAGIOTTI L, MATTIOLI PL, FEDERICI G, GNASSO A:  
Deletion polymorphism in angiotensin converting enzyme gene associated with carotid wall thickening in a healthy male population.  
*Coron Artery Dis* 1996;7:51–55

RAYNOLDS MV, BRISTOW MR, BUSH EW, ABRAHAM WT, LOWES BD, ZISMAN LS, TAFT CS, PERRYMAN MB:  
Angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*Lancet* 1993;342:1073–1075

RIGAT B, HUBERT C, ALHENC-GELAS F, CAMBIEN F, CORVOL P, SOUBRIER F:  
An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.  
*J Clin Invest* 1990;86:1343–1346

RIGAT B, HUBERT C, CORVOL P, SOUBRIER F:  
PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1).  
*Nucleic Acids Res* 1992;20(6):1433

RILEY WA, BARNES RW, APPLGATE WB, DEMPSEY R, HARTWELL T, DAVIS VC, BOND MG, FURBERG CD:  
Reproducibility of noninvasive ultrasonic measurement of carotid atherosclerosis. The Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study (ACAPS).  
*Stroke* 1992;23:1062–1068

ROSNER B:

Fundamentals of Biostatistics.-5th ed. Pacific Grove, Ca. (Duxbury), 2000

RUIZ J, BLANCHE H, COHEN N, VELHO G, CAMBIEN F, COHEN D, PASSA P, FROGUEL P:  
Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus.

Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3662–3665

SALONEN R, SALONEN JT:

Determinants of carotid intima-media Thickness: a population-based ultrasonography study in eastern Finnish men.

J Intern Med 1991;299:225–231

SAMANI NJ, THOMPSON JR, O`TOOLE L, CHANNER K, WOODS KL:

A meta analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction.

Circulation 1996;94:708–712

SAYED-TABATABAEI FA, HOUWING-DUISTERMAAT JJ, VAN DUIJN CM, WITTEMAN JC:

Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis.

Stroke 2003;34:1634–1639

SAYED-TABATABAEI FA, SCHUT AF, HOFMAN A, BERTOLI-AVELLA AM, VERGEER J, WITTEMAN JC, VAN DUIJN CM:

A study of gene--environment interaction on the gene for angiotensin converting enzyme: a combined functional and population based approach.

J Med Genet 2004;41:99–103

SCHMINKE U, HILKER L, MOTSCH L, KESSLER C:

Volumetric assessment of plaque progression with 3-dimensional ultrasonography under statin therapy.

J Neuroimaging 2002;12(3):245–251

SHARMA P:

Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998;64:227–230

SIEDEL J, HÄGELE EO, ZIEGENHORN J, WAHLEFELD AW:

Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency.

Clin Chem 1983;29:1075–1080

SKEGGS LT, DORER FE, KAHN JR, LENTZ KE, LEVINE M:

The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension.

Am J Med 1976;60:737–748

Statistisches Bundesamt Deutschland 2005

<http://www.statistisches Bundesamt.de>

STENSLAND-BUGGE E, BONAA KH, JOAKIMSEN O:

Age and sex differences in the relationship between inherited and lifestyle risk factors and subclinical carotid atherosclerosis: the Tromso Study.

Atherosclerosis 2001;154:437–448

SOUBRIER F, ALHENC-GELAS F, HUBERT C, ALLEGRIANI J, JOHN M, TREGAR G, CORVOL P:

Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning.

Proc Natl Acad Sci 1988;85:9386–9390

STOUFFER GA, OWENS GK:

Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor-beta.

Circulation research 1992;70:820–828

SZOLNOKI Z, SOMOGYVÁRI F, KONDACS A, SZABÓ M, FODOR L:

Evaluation of the interactions of common genetic mutations in stroke subtypes.

J Neurol 2002;249:1391–1397

TANG R, HENNING M, THOMASSON B, SCHERZ R, RAVINETTO R, CATALINI R, RUBBA P, ZANCHETTI A, BOND MG:

Baseline reproducibility of B-mode ultrasonic measurement of carotid artery intima-media thickness: the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA).

Hypertension 2000;18(2):197–201

TARNOW L, CAMBIEN F, ROSSING P, NIELSEN FS, HANSEN BV, LECERF L, POIRIER O, DANILOV S, BOELSKIFTE S, BORCH-JOHNSEN K, PARVING HH:

Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy.

Diabetologia 1995;38:798–780

The ARIC Investigators:

The Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) study: Design and Objectives.

Am J Epidemiol 1989;129:687–702

The CONSENSUS Trial Study Group:

Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS).

N Engl J Med 1987;316(23):1429–1435



TIRET L, RIGAT B, VISVIKIS S, BREDA C, CORVOL P, CAMBIEN F, SOUBRIER F:  
Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the  
angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels.  
Am J Hum Genet 1992;51:197–205

TUMMALA PE, CHEN X, SUNDELL CL, LAURSEN JB, HAMMES CP, ALEXANDER RW,  
HARRISON DG, MEDFORD RM:  
Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat  
vasculature. A potential link between the rennin-angiotensin system and  
atherosclerosis.  
Circulation 1999;100:1223–1229

UEDA S, WEIR CJ, INGLIS GC, MURRAY GD, MUIR KW, LEES KR:  
Lack of association between angiotensin converting enzyme gene  
insertion/deletion polymorphism and stroke.  
Hypertension 1995;13:1597–1601

UNTERBERG C, KREUZER H, BUCHWALD AB:  
Das Renin-Angiotensin-System bei kardiovaskulären Erkrankungen.  
Med Klin 1998;93:416–425

VARDA NM, PETERLIN B, BRADAC SU, GREGORIC A:  
Carotid artery intima-media thickness and angiotensin-converting enzyme gene  
polymorphism in the offspring of parents with premature stroke.  
Acta Paediatrica 2005;94:33–37

VON REUTERN GM, VON BÜDINGEN HJ:  
Ultraschalldiagnostik der hirnersorgenden Arterien.  
Thieme, Stuttgart, 2. Auflage, 1993

WARNICK GR, BENDERSON J, ALBERS JJ:

Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol.

Clin Chem 1982;28:1379–1388

WATTANAKI K, FOLSOM AR, CHAMBLESS LE, NIETO FJ:

Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.

Am Heart J 2005;149:606–612

WEBER H, TAYLOR DS, MOLLOY CJ:

Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells.

J Clin Invest 1994;93:788–798

WINKELMANN BR, NAUCK M, KLEIN B, RUSS AP, BOHM BO, SIEKMEIER R, IHNKEN K, VERHO M, GROSS W, MARZ W:

Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease.

Ann Intern Med 1996;125:19–25

WONG J, PATEL RA, KOWEY PR:

The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors.

Prog Cardiovasc Dis 2004;47(2):116–120

YAMASAKI Y, KATAKAMI N, SAKAMOTO K, KANETO H, MATSUHISA M, SATO H, HORI M, HANEDA M, KASHIWAGI A, TANAKA Y, KAWAMORI R, KUNO S:

Combination of multiple genetic risk factors is synergistically associated with carotid atherosclerosis in Japanese subjects with type 2 diabetes.

Diab Care 2006;29:2445–2451

ZEE R, RIDKER PM, STAMPFER ML, HENNEKENS CH, LINDPAINNER K:  
Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion  
polymorphism and the risk of stroke.  
Circulation 1999;99:340–343

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Apo	Apolipoprotein
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
B	brightness
bp	Basenpaarung
bzw.	beziehungsweise
CM	Community Medicine
CUDAS	Carotid Ultrasound Disease Assessment Study
cw	continuous Wave
D	Deletion
d. h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
ECTIM	Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EVA	Etude sur le vieillissement arterial
HDL	High density lipoprotein
I	Insertion
IMT	Intima-media-Thickness
KI	Konfidenzintervall
LDL	Low density lipoprotein
MHz	Megahertz
mm	Milimeter
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
MONICA	Monitoring trends and Determinants in Cardiovascular disease

mRNA	messenger-ribonucleic acid
µl	Mikroliter
n	Anzahl
n. s.	nicht signifikant
OPERA	Oulu Project Elucidating Risk of Atherosclerosis
OR	Odds Ratio
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-System
SD	Standard Deviation
SHIP	Study of Health in Pomerania
Tab.	Tabelle
V.	Vena
WHO	World Health Organisation

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Halle (Saale), 30.01.2009

## 10. Lebenslauf

### Personalien

Name	Anke Barnasch, geb. Kilian
Geburtstag	29.07.1976
Geburtsort	Greifswald
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet, ein Sohn

### Beruflicher Werdegang

Seit 05/2009	Weiterbildungsassistentin in der Kinderklinik am Klinikum Kassel
07/2008-04/2009	Weiterbildungsassistentin in der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2007-06/2008	Elternzeit
02/2005 - 07/2007	Weiterbildungsassistentin für Kinder- und Jugendmedizin in der Kinderabteilung des Klinikums Mansfelder Land, Eisleben

### Studium

12/2004 – 01/2005	Promotionsstudentin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
11/2004	Erhalt der Approbation
11/2004	Ärztliche Prüfung
10/1998 - 11/2004	Medizinstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald

### Berufsausbildung

08/1995 – 06/1998	Ausbildung zur Zahnarzhelferin
-------------------	--------------------------------

## **Schulbildung**

09/1991 – 06/1995

Gymnasium Grimmen

Schulabschluss 06/1995

Abitur

09/1987 – 08/1991

Robert-Koch-Oberschule Grimmen

09/1983 – 08/1987

Grundschule Grimmen

Halle (Saale), 30.01.2009



## **11. Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. Kessler für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Bearbeitung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Schminke, der mich als direkter Betreuer an die wissenschaftliche Arbeit heranführte und mir mit seinen Vorschlägen und Kritiken sehr geholfen hat.

Dank auch an die Mitarbeiter des Institutes für Humangenetik für die genetischen Analysen sowie an die Mitarbeiter der Community Medicine für die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke meinem Mann Jens für seine Unterstützung und Geduld, für seine Liebe und Aufmunterungen in allen Lebenslagen.

Halle (Saale), 30.01.2009