

Aus dem
**Institut für Klinische Diabetologie des
Deutschen Diabetes Zentrums
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Roden

**Das diabetische Fußsyndrom –
erhöhte Immunparameterkonzentrationen
als ein möglicher Erklärungsversuch
der chronischen Wundheilungsstörung?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Weigelt

2009

Als
Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät
der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf

Gez.: Prof. Dr. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Martin
Koreferent: Priv-Doz. Dr. Schmitz

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Das diabetisches Fußsyndrom.....	1
1.1.1.	Epidemiologie.....	1
1.1.2.	Ätiologie.....	2
1.1.3.	Diagnostik.....	4
1.1.4.	Therapie und Prävention.....	5
1.2.	Wundheilungsstörung.....	7
1.3.	Inflammation und Typ 2 Diabetes.....	10
1.4.	Zytokine und Chemokine.....	11
1.5.	Akut-Phase-Proteine.....	16
1.6.	Ziel dieser Arbeit.....	16
2.	Material, Methoden und Studienkollektiv	
2.1.	Material	
2.1.1.	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.2.	Geräte.....	18
2.1.3.	Reagenzien.....	19
2.1.4.	ELISA.....	19
2.1.5.	Bead-basierter Multiplex-Immunoassay.....	19
2.1.6.	Sterilisation der Chemikalien und Geräte.....	21
2.1.7.	Stammlösungen und Puffer.....	21
2.2.	Methoden	
2.2.1	Studienkollektiv.....	23
2.2.1.1.	Rekrutierung und Blutentnahme.....	23
2.2.1.2.	Weiterverarbeitung der Proben.....	23
2.2.1.3.	Klinisch-chemisches Routinelabor.....	24
2.2.1.4.	Klinische Patientencharakteristika.....	24
2.2.1.5.	Klassifikation des Diabetes.....	24
2.2.1.6.	Klassifikation des Fußsyndroms.....	25
2.2.1.7.	Infektionsgrad.....	25
2.2.1.8.	Hypertonie und Hyperlipidämie.....	26

2.2.1.9.	Erstellung der Analysedatenbank.....	26
2.2.2.	Analyse der Immunparameter.....	28
2.2.2.1.	ELISA.....	28
2.2.2.2.	Generelles Protokoll für Zytokin-ELISA.....	30
2.2.2.3.	ELISA-Protokoll für IL-6.....	31
2.2.2.4.	ELISA-Protokoll für MIF.....	32
2.2.2.5.	ELISA-Protokoll für RANTES.....	33
2.2.2.6.	Auswertung der ELISA-Platten.....	34
2.2.2.7.	Qualitätskontrolle und Normalisierung der ELISA-Platten.....	34
2.2.2.8.	Bead-basierter Multiplex-Immunoassay.....	34
2.2.2.9.	Protokoll für die Kopplung der Mikrosphären.....	36
2.2.2.10.	Generelles Protokoll für Multiplex-Immunoassay.....	37
2.2.2.11.	Protokoll für Multiplex-Immunoassay.....	37
2.2.2.12.	Auswertung der Luminex-Platten.....	38
2.2.2.13.	Qualitätskontrolle und Normalisierung der Luminex-Platten.....	39
2.2.3.	Computerprogramme.....	39
3.	Ergebnisse	
3.1.	Allgemeine Daten und Patientencharakteristika.....	41
3.1.1.	Alters- und Geschlechterverteilung.....	41
3.1.2.	Häufigkeit von Begleiterkrankungen.....	43
3.2.	Vergleich der Immunmediatoren von Patienten vs. Kontrollen.....	43
3.2.1.	Korrelationen der Immunmediatoren untereinander.....	46
3.2.2.	Regressionsmodelle.....	47
3.3.	Lokalisation der Ulzera und Infektionsgrad.....	48
3.4.	Schwere des diabetischen Fußsyndroms und klinische Variablen.....	49
3.5.	Schwere des diabetischen Fußsyndroms und Immunmediatoren.....	51
3.6.	Infektionsgrad und Immunmediatoren.....	53
3.7.	Vergleich der Immunmediatoren von Patienten im Verlauf.....	57
3.8.	Vergleich der Immunmediatoren-Spiegel von Patienten (14 Tage nach Aufnahme) und Kontrollen.....	59
3.9.	Assoziation klinischer Variablen auf Verlauf der Immunmediatoren.....	60

4.	Diskussion	
4.1.	Einleitung.....	62
4.2.	Studienkollektiv und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer....	63
4.3.	Subklinische Inflammation in der Patientengruppe.....	64
4.4.	Determinanten der Immunmediatoren.....	69
4.4.1.	Einfluss des Wagner-Stadiums auf die Immunmediatoren.....	69
4.4.2.	Einfluss des Infektionsgrades auf die Immunmediatoren.....	70
4.4.3.	Einfluss klinischer Variablen auf die Schwere des Fußsyndroms.....	70
4.4.4.	Einfluss klinischer Variablen auf den Verlauf der Immunmediatoren.....	71
4.5.	Änderung der Inflammation im Heilungsverlauf.....	71
4.6.	Studienlimitationen und Studienstärken.....	73
4.6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	73
5.	Literaturverzeichnis.....	75
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	90
7.	Danksagungen.....	92
8.	Lebenslauf.....	93
9.	Zusammenfassung.....	94

As the radius of knowledge gets longer,
the circumference of the unknown increases even more.

Bartha Maria Knoppers

1. Einleitung

1.1. Das diabetische Fußsyndrom

Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) versteht man unter einem diabetischen Fußsyndrom eine Infektion, Ulzeration und/oder Zerstörung tiefer Gewebe am Fuß, verbunden mit neuropathischen Störungen sowie peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen unterschiedlichen Grades am Unterschenkel eines Patienten mit Diabetes mellitus¹.

1.1.1. Epidemiologie

Durch die weltweit steigende Inzidenz des Diabetes mellitus² hat auch das diabetische Fußsyndrom als eine Folgeerkrankung des Diabetes immer mehr an Bedeutung gewonnen³. In verschiedenen Studien wurde die jährliche Inzidenz von diabetischen Fußulzera auf 2 – 5,4% bei Diabetikern geschätzt⁴⁻⁶, während die Prävalenz auf 4 bis 10% und die Lebenszeitprävalenz zwischen 15 und 25% geschätzt wird^{7:8}, d.h. jeder vierte Diabetiker entwickelt im Laufe seines Lebens ein diabetisches Fußulkus.

Unter den diabetischen Folgeerkrankungen stellt das diabetische Fußsyndrom nicht nur für den betroffenen Patienten eine bedeutende Einschränkung der Lebensqualität dar⁹, sondern auch die wirtschaftlichen Folgen für den Patienten selbst, für das Gesundheitssystem und die Volkswirtschaft sind erheblich^{10:11}. Dabei ist das diabetische Fußsyndrom keine reine Spätkomplikation des Diabetes, sondern findet sich auch schon im ersten Jahr nach Diagnosestellung¹². Darüber hinaus ist es der häufigste Hospitalisierungsgrund bei Diabetikern¹³, welche im Vergleich zu Nicht-Diabetikern insgesamt ein 10-mal höheres Risiko haben, aufgrund einer Weichteil- oder Knocheninfektion der unteren Extremität hospitalisiert zu werden. Diabetische Fußulzera sind für 50% aller Krankenhaustage bei Diabetikern verantwortlich¹⁴.

Auch die Folgen eines diabetischen Fußsyndroms sind erheblich. So werden in der Bundesrepublik Deutschland jährlich über 30.000 Amputationen an Diabetikern durchgeführt, die Hälfte davon als Majoramputationen¹⁵. Dies entspricht etwa zwei Drittel aller in Deutschland durchgeführten Amputationen. Wer eine Extremität durch Amputation verliert, hat innerhalb von einem Jahr eine Wahrscheinlichkeit von 10%, auch die gegenseitige Extremität durch eine Amputation zu verlieren, innerhalb von 4 Jahren steigt diese Wahrscheinlichkeit auf mehr als 50%¹⁶. Das Lebenszeitrisiko,

eine Extremität durch Amputation zu verlieren, ist bei Patienten mit Diabetes mellitus etwa 30-mal höher als bei Nicht-Diabetikern¹⁷. Auch die Mortalität von Patienten mit diabetischem Fußsyndrom steigt im Vergleich zu Diabetikern ohne Fußulzera mehr als 2-fach an¹⁸.

Das diabetische Fußsyndrom stellt somit eine schwerwiegende und in den letzten Jahren immer wichtiger werdende diabetische Folgeerkrankung dar, die ein besseres Verständnis von Ätiologie, Pathogenese und Therapie erfordert.

1.1.2. Ätiologie

Die klassischen Ursachen, auf die man das diabetische Fußsyndrom zurückführt, sind die diabetische Polyneuropathie und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK). Weitere identifizierte Risikofaktoren für die Entwicklung eines diabetischen Fußsyndroms sind eine verminderte Gelenkbeweglichkeit, Fußdeformitäten (wie z.B. ein Hallux valgus) sowie eine zunehmende Erkrankungsdauer des Diabetes mellitus¹⁹⁻²¹.

Ging man früher noch von einer eher heterogenen Verteilung der Ursachen für die Entstehung eines diabetischen Fußsyndroms aus, so sieht man heute ätiologisch die diabetische Neuropathie als führend an²². Hierbei bewirkt die Kombination aus erhöhten plantaren Drücken bei vorbestehender Polyneuropathie²³ die Ausbildung eines meist im Bereich des Vorfußes, seltener im Bereich des Mittelfußes oder an der Ferse lokalisierten Ulkus²⁴. Dem gegenüber ist das ischämisch bedingte Ulkus meist akral lokalisiert und imponiert als Teil- oder komplette Nekrose einer oder mehrerer Zehen.

Diabetische Polyneuropathie und diabetisches Fußsyndrom

Bei der diabetischen Polyneuropathie kommt es zur Schädigung der sensiblen, motorischen und autonomen Nervenfasern. Die Frage nach der Pathogenese der diabetischen Polyneuropathie wird derzeit lebhaft diskutiert und kann noch nicht abschließend beantwortet werden²⁵. Es scheint aber klar, dass die Hyperglykämie der entscheidende Faktor ist. Anhaltende Hyperglykämie führt zur Überaktivierung verschiedener Stoffwechselwege, z.B. des Polyol- und Hexosamin-Stoffwechsels. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Bildung von sogenannten AGEs (advanced glycation end products), deren Akkumulation zur Funktionseinschränkung führt. All diese Mechanismen gipfeln in der Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies, oxidativem Stress und in der Aktivierung des Immunsystems, in Folge dessen es zur Schädigung kleiner und großer Gefäße und Nerven kommt²⁶⁻²⁹. Die Prävalenz der diabetischen Neuropathie wird bei Diabetikern mit 15 – 50 % angegeben^{30,31}.

Es treten zumeist distal beginnende, symmetrische, sensible Defizite aller Qualitäten (Druck, Schmerz, Lagesinn, Vibration) bis hin zu neuropathischen Schmerzen, Muskelparesen und vegetativer Dysregulation auf. Die autonome Neuropathie führt zu einer verminderten Schweiß- und Talgbildung, die daraus resultierende trockene und spröde Haut erhöht das Risiko der Entstehung von Rissen und Rhagaden, welche sich dann zu einem Ulkus entwickeln können. Zum einen wird eine Hautschädigung beispielsweise durch zu enges Schuhwerk oder Temperaturschädigung von den Patienten wegen verminderter oder fehlender Nozizeption nicht oder zu spät wahrgenommen, zum anderen kann es durch die motorische Innervationsstörung zu einer muskulären Imbalance mit der Ausbildung von Fußdeformitäten wie Krallen- oder Hammerzehen kommen. Hieraus resultieren Fehlbelastungen, welche zur Ausbildung von Druckulzera oder zu einer diabetischen Neuroosteoarthropathie, dem so genannten Charcot-Fuß, führen können³².

Darüber hinaus führt die Neuropathie selbst durch Störung der Mikrozirkulation zu einer gestörten Wundheilung^{33,34}, wodurch selbst physiologische Druckbelastungen in der Ausbildung eines Ulkus münden können.

Periphere arterielle Verschlusskrankheit und diabetisches Fußsyndrom

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (paVK) handelt es sich um die Manifestation der Atherosklerose an den Extremitätenarterien im Sinne einer Makroangiopathie^{35,36}. Klinisch kommt es zur zunehmenden Ischämie mit den Symptomen Blässe, Kältegefühl und anfangs bewegungsabhängigen Schmerzen, später Ruheschmerzen.

Die Prävalenz der paVK unter Diabetikern wird mit 10,8 – 36 % angegeben^{37,38}. Das Risiko eines Diabetikers, eine paVK zu entwickeln, steigt pro 1% Erhöhung des HbA1c-Wertes um 14%³⁹.

Die paVK selbst ist keine diabetes-spezifische Erkrankung, sondern ist ebenso mit weiteren Risikofaktoren wie inhalativem Zigarettenrauchen, arterieller Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Hypothyreose assoziiert⁴⁰. Das Verteilungsmuster der betroffenen Arterien ist jedoch bei Diabetikern im Vergleich zu nicht-diabetischen

paVK-Patienten verschieden: die Unterschenkelarterien sind häufiger betroffen, während die Fußarterien meist ausgespart bleiben⁴¹. Auch kommt es bei Diabetikern nicht zu einer unterschiedlichen Geschlechterverteilung der paVK, während bei Nichtdiabetikern eine paVK deutlich häufiger bei Männern als bei Frauen zu finden ist. Ebenso sind Diabetiker mit paVK jünger als Nichtdiabetiker, bei denen eine paVK diagnostiziert wird⁴².

Neben der diabetischen Polyneuropathie ist die paVK der häufigste Grund für die Ausbildung eines diabetischen Fußsyndroms, wobei nicht immer ein einziger Faktor als Ursache zu eruieren ist: in ungefähr 1/3 der Fälle sind diabetische Polyneuropathie und paVK gleichzeitig ursächlich für die Entstehung chronischer, nicht-heilender Ulzera. Über welchen exakten Mechanismus die Ischämie zur Wundheilungsstörung beiträgt, wird derzeit lebhaft diskutiert.

1.1.3. Diagnostik

Das diabetische Fußsyndrom wird nach Wagner und Armstrong in Stadien eingeteilt, um eine valide, regelmäßige und individuelle Verlaufsdokumentation auch für die mitbehandelnden Fachbereiche zu schaffen. Hierbei wird das diabetische Ulkus anhand seiner Penetrationstiefe und anhand des Vorliegens von Infektions- und Ischämiezeichen klassifiziert. Gleichzeitig empfiehlt sich eine Fotodokumentation mit Datum, Maßstab und Patientenidentifikation.

Neben einer internistischen Basisuntersuchung sollte der Häufigkeit der Ätiologie folgend im Weiteren die Diagnostik einer Neuropathie sowie einer paVK im Vordergrund stehen. Nach einer spezifizierten Anamnese, in der man das Vorliegen von Par- und Hyperästhesien, Thermhypästhesien und Schmerzen abfragt, folgt die gezielte Inspektion und Palpation beider Füße. Auch das Gang- und Standbild sowie das Schuhwerk sollten inspiziert werden⁴³.

Der neuropathische Fuß erscheint rosig, trocken und warm bei tastbaren Fußpulsen. Häufig finden sich Risse, Rhagaden und Hyperkeratosen, während bei Vorliegen einer paVK die Fußpulse fehlen und ein blasser, kalter Fuß imponiert. Sowohl die Messung der Vibrationsempfindung mit 128-Hz-Stimmgabel nach Rydell-Seifer als auch Testung auf Berührungsempfinden mit dem 10-g-Monofilament nach Weinstein sind probate Screening-Methoden, um eine Neuropathie zu erfassen, da bei pathologischem Testergebnis eine Assoziation mit der Entwicklung eines diabetischen Fußsyndroms beschrieben wurde⁴⁴. Die endgültige Diagnose einer

diabetischen Polyneuropathie erfolgt jedoch nach dem Ausschluss anderer möglicher Ursachen⁴⁵. Die angiologische Untersuchung umfasst die Erhebung des Pulsstatus sowie die Messung der Doppler-Verschlussdrücke (Doppler-Index, Knöchel-Arm-Index).

1.1.4. Therapie und Prävention

Anhand der Wundgröße und der zugrunde liegenden Störungen lässt sich die zu erwartende Zeitspanne bis zur kompletten Wundheilung abschätzen^{46;47}. Die mediane Wundheilungszeit beim diabetischen Fußsyndrom beträgt 6 Monate⁴⁸, was erneut die gesundheitspolitische Relevanz, aber vor allem die Bedeutung für den Patienten selbst noch einmal unterstreicht.

Die Therapie des diabetischen Fußsyndroms soll interdisziplinär erfolgen, wobei nicht entscheidend ist, welcher Fachbereich die Therapie koordiniert, sondern wie gut die Vernetzung mit den jeweilig angrenzenden Disziplinen ist, so dass diagnostische und therapeutische Schritte in gegenseitiger Absprache durchgeführt werden können. Allein durch eine interdisziplinäre Behandlung kann die Major-Amputationsrate um 75% reduziert werden⁴⁹.

Konservative Therapie

Die Basis einer jeden Therapie stellt die Schaffung eines druckentlasteten, gut durchbluteten und infektfreien Wundbettes dar. Hieraus leitet sich das notwendige Vorgehen ab: Die Diagnose einer pAVK sollte zeitnah revaskularisierende Maßnahmen zur Folge haben, bei initial bestehenden klinischen Zeichen einer Infektion sollte nach Abstrichentnahme eine breit angelegte, antibiotische Therapie begonnen werden, auch wenn hierfür eine ausreichende und zufrieden stellende Datenlage derzeit noch nicht vorliegt⁵⁰. Bei Vorliegen einer Osteomyelitis sollte die antibiotische Therapie über mindestens 6 Wochen fortgeführt werden. Der Fuß muss konsequent entlastet und eventuell ruhig gestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass tägliches chirurgisches Debridement die mediane Wundheilungszeit um bis zu 25% entscheidend verkürzt⁵¹. Ferner ist eine Optimierung der Stoffwechsellage, zum Beispiel durch Umstellung auf eine intensivierete Insulintherapie, anzustreben. Dies führt ebenfalls zur Verkürzung des Wundheilungsprozesses⁵².

Operative Therapie

Die operative Therapie in Form der Amputation hat ihren Stellenwert in der Therapie des diabetischen Fußsyndroms größtenteils verloren. Sie beschränkt sich heute auf ischämisch bedingte, trotz Revaskularisationstherapie nicht heilende Ulzera oder Nekrosen kompletter Zehen oder Fußteile. Ferner ist eine Amputation als ultima ratio bei unter intensiver konservativer Therapie nicht heilenden Ulzera in Betracht zu ziehen. Trotz verbesserter konservativer Therapiekonzepte sind diabetische Ulzera weiterhin die häufigste Indikation zur Amputation im Bereich der unteren Extremität: Sie werden 10- bis 46-mal häufiger bei Diabetikern durchgeführt als in der Normalbevölkerung⁵³⁻⁵⁵. Allerdings wird eine große Variabilität an Inzidenzen in verschiedenen Ländern zu verschiedenen Zeitpunkten von 1,1 – 18 / 1000 Diabetikern beschrieben⁵⁶. Als Faktoren, die das Risiko einer Amputation erhöhen, konnten das gleichzeitige Vorliegen einer paVK sowie die bakterielle Infektion der Wunde identifiziert werden⁵⁷.

Innovative Therapiekonzepte

Auch wenn die meisten Ulzera bei frühzeitiger Diagnose und adäquater Therapie beherrschbar sind, wurden in den letzten Jahren einige neue Therapiekonzepte etabliert. Hierunter fallen die lokale Applikation von autologen Keratinozytentransplantaten⁵⁸, von Wachstumsfaktoren⁵⁹, von Fliegenlarven⁶⁰ sowie von Proteaseinhibitoren⁶¹, die hyperbare Sauerstofftherapie⁶² als auch die Vakuumpumpentherapie⁶³.

Prävention

Mit zunehmender Prävalenz des Typ 2 Diabetes kommt auch der Prävention des diabetischen Fußsyndroms eine immer bedeutendere Rolle zu. Schon 1989 erkannte man die Notwendigkeit präventiver Maßnahmen: gemeinsam erklärten WHO und die Internationale Diabetes Föderation in der St. Vincent Deklaration, neben der Reduktion weiterer Diabetes-assoziiertes Folgeerkrankungen die Amputationsrate in den nächsten 10 Jahren um 50% reduzieren zu wollen⁶⁴. Dieses Ziel wurde in Deutschland nicht nur nicht erreicht⁶⁵, die Inzidenz der durch Diabetes mellitus bedingten Amputationen stieg sogar weiter an⁶⁶.

Diabetespatienten sollten über das allgemeine sowie ihr individuelles Risiko, ein diabetisches Fußsyndrom zu entwickeln, aufgeklärt werden. Die Erhebung des

Fußbefundes sollte bei allen Diabetikern mindestens einmal jährlich durchgeführt werden. Regelmäßige Fußpflege sowie die Anpassung des Schuhwerkes sollte vorgenommen, ebenso wie auch prophylaktische Interventionen mit dem Patienten diskutiert werden sollten⁶⁷, wie z.B. die Durchführung einer Revaskularisationstherapie bei bestehender paVK.

1.2. Wundheilungsstörung

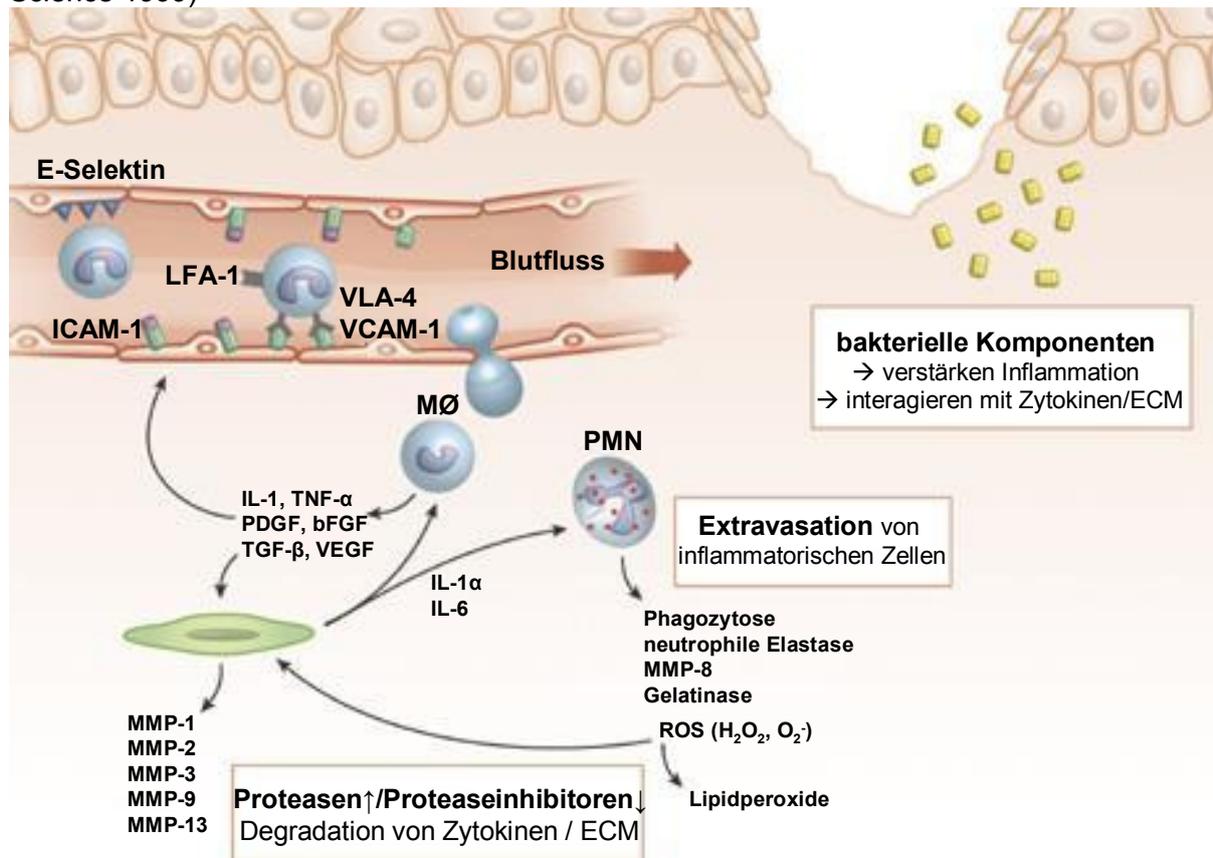
Während man in diversen Studien die verschiedenen Risikofaktoren für die Entwicklung eines diabetischen Fußsyndroms hat identifizieren können^{6;20;68}, bleibt die Pathophysiologie des diabetischen Fußsyndroms im Detail noch unverstanden. Zentrales Charakteristikum des diabetischen Fußsyndroms ist - ausgelöst durch in- und extrinsische Faktoren⁶⁹ - eine chronische Wundheilungsstörung, in deren Entstehung wiederum das Immunsystem die führende Rolle zu spielen scheint.

Zytokine und Wundheilung

Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess und umfasst eine komplexe Interaktion zwischen epidermalen und dermalen Zellen, der extrazellulären Matrix, einer kontrollierten Angiogenese sowie verschiedener Plasmaproteine.

Informationen über die genaue Ausbildung und Zusammensetzung der infiltrierenden Zellen sind spärlich⁷⁰. Der Wundheilungsprozess (Abbildung 1) wird klassischerweise in drei verschiedene Phasen unterteilt, welche nicht streng nacheinander ablaufen, sondern sich zeitlich überlappen: exsudative (inflammation), proliferative (tissue formation) und reparative Phase (tissue remodeling). Hier laufen verschiedenste Prozesse nebeneinander ab. Die Koordination und Interaktion zwischen den verschiedenen Zellen geschieht über eine Vielzahl an Zytokinen, darunter Interleukine, Chemokine und Wachstumsfaktoren⁷¹. Bei der Interaktion mit der Wundmatrix kommt der Gruppe der Integrine eine Schlüsselrolle zu⁶⁹.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wundheilung (modifiziert nach Hunt et al., Science 1999)



bFGF: basic fibroblast growth factor; ECM: Extrazellulärmatrix; ICAM-1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; IL: Interleukin; LFA-1: Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen-1; MMP: Matrix-Metalloproteinase; MØ: Makrophagen; PDGF: platelet derived growth factor; PMN: polymorphkernige Neutrophile; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; TGF: transforming growth factor; VLA-4: very late antigen-4; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; VEGF: vascular endothelial growth factor

In der Pathogenese von chronischen Wunden nimmt die Phase der Inflammation eine Schlüsselstellung ein⁷². Bei einer regulär abheilenden, akuten Wunde kommt es während dieser Phase zur massiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, zum Abräumen des nekrotischen Gewebes und der bakteriellen Kontamination sowie zur Rekrutierung und Aktivierung von Fibroblasten. Dagegen ist bei chronischen Wunden initial die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen verzögert und diese verweilen auch unphysiologisch lange im Wundbett⁷³. Die Inflammation wird durch andauerndes Gewebetrauma in Form von anhaltendem mechanischem Druck oder einer Infektion dauerhaft aufrechterhalten. Dies führt zur unverhältnismäßigen Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (v.a. MMP-8 und MMP-9)⁷⁴ und neutrophiler Elastase, was wiederum zur andauernden und inadäquaten Gewebedestruktion führt⁷⁵, die proliferative und reparative Phase

finden verzögert oder gar nicht statt: es kommt zur Ausbildung einer chronischen Wunde.

Neben den Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- β (transforming growth factor)⁷⁶ werden als Zytokine, welche in der Wundheilung wichtig zu sein scheinen, immer wieder IL-6, IL-8, MCP-1⁷⁷, MIP-1 α ⁷⁸ TNF- α , IL-1 α und IL-1 β ⁷⁹, IP-10 sowie MIF⁸⁰ genannt. Einige dieser Zytokine und Chemokine wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Wundheilungsstörung bei Diabetikern kann einerseits Folge begleitender Umstände wie einer bakteriellen Infektion, einer Gewebeischämie oder andauernder Traumatisierung sein, andererseits führt der Diabetes selbst zur Wundheilungsstörung. Schon 1977 wurde postuliert, dass die Hyperglykämie für die Wundheilungsstörung verantwortlich sei⁸¹. Letztlich konnte gezeigt werden, dass erhöhte Blutzuckerwerte zu einer Störung des angeborenen Immunsystems (innate immunity) und somit auch zu einer verzögerten Wundheilung führen⁸². Hier werden verschiedene Pathomechanismen diskutiert. Erhöhte Blutzuckerspiegel scheinen über die Bildung sogenannter advanced glycation end products (AGEs) zu einer Alteration intrazellulärer Signalkaskaden, veränderter Genexpression, vermehrter Sekretion proinflammatorischer Mediatoren und Bildung freier Radikale zu führen⁸³, was wiederum eine verminderte Zellmigration, Zellproliferation und Angiogenese zur Folge hat^{84;85}. Neuerdings wird auch die endotheliale Dysfunktion als ein möglicher ursächlicher Faktor für eine gestörte Wundheilung angesehen⁸⁶. Die endotheliale Dysfunktion ist das aktuell favorisierte Modell zur Entstehung der Atherosklerose, welche häufig mit dem Vorliegen eines Diabetes assoziiert ist. In der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt wiederum auch die Hyperglykämie ätiologisch eine wichtige Rolle⁸⁷.

Da die Wundheilung ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen, Proteinen und Mediatoren des Immunsystems darstellt, sind in den letzten Jahren zunehmend die Mediatoren, vor allem Zytokine und Chemokine, als ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt ins Interesse wissenschaftlicher Betrachtungen gerückt. Ebenso wie bei der Wundheilung scheint bei der Pathogenese des Diabetes mellitus selbst das Immunsystem eine führende Rolle zu spielen⁸⁸.

1.3. Inflammation und Typ 2 Diabetes

Pathogenetisch kommt es beim Typ 2 Diabetes auf Basis einer Insulinresistenz zu einem Sekretionsversagen der pankreatischen β -Zellen, wobei in beiden Fällen inflammatorische oder immunologische Faktoren beteiligt sind. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-6 interferieren nach Bindung an die Zielzellen mit dem Insulinsignalweg. Die Phosphorylierung von Serinresten am Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) führt zu einer Beeinträchtigung der Signaltransduktion des Insulinrezeptors und scheint der Schlüsselschritt zu sein. Dies kann über die Aktivierung der Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) vermittelt werden, gleichzeitig werden aber auch andere inflammationsassoziierte Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren wie die Proteinkinase C und NF κ B (nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B) aktiviert, was zur Wirkungsabschwächung des Insulins führt⁸⁹⁻⁹¹. Weiter führt IL-6 zur Induktion des Proteins SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3), das eine verminderte Autophosphorylierung des Insulinrezeptors⁹² und den Abbau der in den Insulinsignalweg eingebundenen Proteine IRS-1 und IRS-2 induziert⁹³ und damit ebenfalls in einer Wirkabschwächung des Insulins resultiert. Erhöhte Serumspiegel an IL-6, TNF- α , IL-1 α und IL-1 β führen darüber hinaus zur Herunterregulation von PPAR- γ (Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor), dem Angriffspunkt der Thiazolidindione, und beeinflussen so ebenfalls die Insulinsensitivität negativ⁹⁴. Ebenso reduzieren Immunmediatoren die Insulinsensitivität indirekt über Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse oder die Modulation der regulatorischen Funktion des Fettgewebes über das Hormon Leptin. Neben der Insulinresistenz ist die Insulinsekretionsstörung eine entscheidene Komponente des Typ 2 Diabetes⁹⁵, welche durch den Untergang von pankreatischen β -Zellen bedingt wird⁹⁶, die unter Beteiligung von verschiedenen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 oder Leptin zu Stande zu kommen scheint.

Ein Zusammenhang von subklinischer, systemischer Inflammation und Typ 2 Diabetes wurde zum ersten Mal 1997 postuliert^{97;98}. In weiteren prospektiven Studien konnte daraufhin gezeigt werden, dass Patienten, die später einen Diabetes entwickeln würden, schon Jahre vor Diagnosestellung erhöhte Serumkonzentrationen von CRP, PAI-1, Serumamyloid A, IL-6, IL-18, MIF und MCP-1 aufwiesen⁹⁹⁻¹¹¹. Jedoch gibt es auch Autoren, die systemisch erhöhte

inflammatorische Marker im Serum eher als Folge denn als Ursache der Insulinresistenz ansehen¹¹².

Es gibt weitere Arbeiten, die eine Assoziation zusätzlicher Zytokine und Chemokine mit dem Vorliegen einer Adipositas, welche einen starken, wenn nicht sogar den stärksten Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes darstellt, nachweisen konnten. So wurde gezeigt, dass die Chemokine MIP-1 α , MCP-1 oder IL-8 in den Stoffwechsel der Adipozyten eingreifen^{113;114}, die systemische Inflammation verstärken und die Entwicklung der Insulinresistenz beschleunigen^{115;116}. Bei Patienten, bei denen eine Adipositas, eine gestörte Glukosetoleranz oder ein Typ 2 Diabetes vorliegen, finden sich zudem erhöhte RANTES-Serumspiegel^{117;118}.

Damit spielen Zytokine und Chemokine sowohl in der Entstehung des Diabetes mellitus als auch in der Wundheilungsstörung eine entscheidende Rolle, und Interaktionen in Bezug auf das diabetische Fußsyndrom sind wahrscheinlich. Im Folgenden soll die Rolle ausgewählter Immunmediatoren näher erläutert werden, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.4. Zytokine und Chemokine

Zytokine betreffen eine Vielzahl biologischer Prozesse: in der Embryonalentwicklung, in der Hämatopoese, in der unspezifischen Antwort auf Infektionen, in der spezifischen Antwort auf Antigene, in der Pathogenese vieler Krankheiten, in der Veränderung kognitiver Leistungen sowie dem degenerativen Prozess des Alterns spielen Zytokine tragende Rollen. Der Begriff der Zytokine wurde 1974 von Stanley Cohen geprägt^{119;120}. Heute umfasst der Begriff der Zytokine eine strukturell heterogene Gruppe von löslichen Proteinen, welche nach Stimulation von Zellen des Immunsystems sowie einer Reihe anderer Zellen sezerniert werden können. Zu ihnen gehören die Interferone, die Interleukine, die Chemokine, die mesenchymalen Wachstumsfaktoren, die Familie der Tumornekrosefaktoren sowie die Adipokine. Die Gruppe der Chemokine wiederum wird nach strukturellen Gesichtspunkten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: die CC-, C-, CXC- und die CX₃C-Chemokine.

Die Mehrzahl der Zytokine sind Peptide oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa. Bei einigen Zytokinen findet sich eine konstitutive, bei anderen eine bedarfsgesteuerte Sekretion¹²¹. Sie dienen der Regulation der Immunantwort und haben hormonähnliche Wirkungen. Häufig findet

man eine autokrine Wirkweise, was bedeutet, dass die sezernierten Zytokine auf die sezernierenden Zellen zurückwirken. Ferner wirken Zytokine parakrin und juxtakrin, seltener auch endokrin. Eine weitere charakteristische Eigenschaft stellt die pleiotrope Wirkung dar, d.h. Zytokine wirken nicht nur auf einen bestimmten Zelltyp, sondern auf viele verschiedene Zelltypen über spezifische, membranständige Rezeptoren¹²². Häufig wirkt ein Zytokin auf mehrere verschiedene Zytokinrezeptoren. Diese Rezeptoren weisen oft eine hohe Affinität zu ihren Liganden auf, so dass die Serumspiegel der verschiedenen Zytokine nur im Bereich von ng/ml oder pg/ml liegen. Zytokine haben eine kurze Halbwertszeit im Serum, da sie von Proteasen und Peptidasen rasch proteolysiert werden.

Funktionell kann man drei verschiedene Gruppen von Zytokinen unterscheiden:

- a) proinflammatorische Zytokine (u.a. TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ) im Sinne einer T_H1-Reaktion
- b) antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- β) im Sinne einer T_H2-Reaktion
- c) Zytokine, welche unter unterschiedlichen Umständen pro- als auch antiinflammatorische Wirkung haben können.

Die Differenzierung von naiven T-Zellen im Sinne einer T_H1-Reaktion führt zur zellvermittelten Immunität, während die Differenzierung in Richtung T_H2-Reaktion zur Ausbildung einer Antikörper-vermittelten, humoralen Immunität führt. Die Aktivierung der T-Zellen erfordert ein doppeltes Signal: zum einen die Bindung des T-Zell-Rezeptors an MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC), zum anderen eine Zell-Zell-Interaktion über weitere Signal- und Adhäsionsmoleküle (kostimulatorisches Signal). Darüber hinaus setzen antigenpräsentierende Zellen Zytokine frei, die zur T-Zell-Differenzierung und Aktivierung beitragen.

Die proinflammatorischen Zytokine führen zu einer Aktivierung des Immunsystems, was die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes beschleunigen könnte, wohingegen die antiinflammatorischen Zytokine zur einer Hemmung des Immunsystems führen und der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes eher protektiv entgegenstehen würden. Bei chronischen, nicht-heilenden Wunden wie beim diabetischen Fußsyndrom kommt es zu einer überschießenden Inflammation, die unter anderem durch

proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL-6, IL-8, MCP-1 oder MIP-1 α mediiert wird. Das bessere Verständnis der verschiedenen Zytokingruppen und deren physiologischen Wirkungen führten zu einer Vielzahl von therapeutischen Strategien in den unterschiedlichsten Disziplinen der Medizin. Einerseits werden Zytokine selbst in ihrer Funktion eingesetzt, wie z.B. die α -Interferone in der Therapie der chronischen Virushepatits, die β -Interferone in der Therapie der schubförmig-remittierenden Variante der Multiplen Sklerose, die Wachstumsfaktoren Erythropoetin und Kolonie-stimulierende Faktoren im Rahmen der Hämatologie und Onkologie. Andererseits macht man sich den antiinflammatorischen Effekt durch Applikation Zytokin-spezifischer Antikörper bei autoimmunologisch getriggerten Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn oder der Graft-versus-Host-Disease zunutze¹²³.

Im Folgenden werden diejenigen Zytokine, Chemokine und Akut-Phase-Proteine näher beschrieben, welche in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes bzw. der Wundheilungsstörung eine wesentliche Rolle spielen und welche in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Interleukin-6 (IL-6) ist das zentrale, proinflammatorische Zytokin der Akut-Phase-Reaktion, welches von Makrophagen, T_H-Zellen sowie verschiedenen mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Es bewirkt bei aktivierten B-Lymphozyten die Differenzierung zu Plasmazellen, bei ausdifferenzierten Plasmazellen kommt es nach Stimulation durch IL-6 zur vermehrten Antikörperproduktion. Als weitere wichtige Lokalisation der IL-6-Sekretion wurde das viszerale Fett identifiziert¹²⁴. IL-6 ist eines der ersten Zytokine gewesen, das in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom oder der Atherosklerose gebracht wurde. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serumspiegel von IL-6 schon mehrere Jahre vor Auftreten einer gestörten Glukosetoleranz oder eines manifesten Diabetes mellitus vorliegen⁹⁹⁻¹⁰¹. IL-6 ist der wesentliche Induktor für die Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen. Im Prozess der Wundheilung wird IL-6 u.a. aus Keratinozyten freigesetzt¹²⁵ und beeinflusst die Expression der für den Abräumprozess wichtigen Matrixmetalloproteinasen sowie deren Regulatorproteinen, den TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases).

MIF (Macrophage migration inhibitory factor) ist ein proinflammatorisches Zytokin der angeborenen Immunität, welches eine zentrale Rolle sowohl in der antimikrobiellen Abwehr als auch der Stress-Antwort spielt. MIF wurde als ein löslicher Faktor beschrieben, der von T-Zellen im Rahmen von allergischen Reaktionen des verzögerten Typs freigesetzt wird¹²⁶. Die Sekretion von MIF ist nicht auf Zellen des Immunsystems beschränkt, es wird nahezu ubiquitär von vielen Zelltypen exprimiert, so auch von pankreatischen β -Zellen oder Adipozyten. Es nimmt Einfluss auf die Insulinsekretion¹²⁷, was suggeriert, dass es eine wichtige Rolle im Glukosemetabolismus spielt. Bei Patienten mit manifesten Typ 2 Diabetes finden sich erhöhte MIF-Serumspiegel¹²⁸.

Interleukin-18 (IL-18) wurde erstmals 1995 als Interferon- γ -induzierender Faktor beschrieben¹²⁹. Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von aktivierten Makrophagen und Kupffer-Sternzellen exprimiert wird und sowohl eine TH₁- als auch eine TH₂-Antwort induzieren kann¹³⁰. IL-18 scheint in die Pathogenese der Atherosklerose involviert zu sein: hier wirkt es plaquedestabilisierend¹³¹. Erhöhte IL-18-Serumspiegel sind mit einem gesteigerten Typ 2 Diabetes-Risiko verbunden¹⁰⁹ und scheinen auch beim Betazelluntergang eine Rolle zu spielen, wie dies bereits für den Typ 1 Diabetes gezeigt werden konnte¹³².

Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) ist ein proinflammatorisches Chemokin, welches von Monozyten gebildet wird, und erstmals 1989 als Neutrophile aktivierendes Protein (NAP-1) bzw. Neutrophile aktivierender Faktor (NAF) beschrieben wurde¹³³, da es ein potenter Aktivator von neutrophilen Granulozyten ist. IL-8 wirkt aber auch auf Makrophagen und Endothelzellen¹³⁴ und scheint angiogenetische Wirkung zu besitzen¹³⁵. Ebenso wie bei MCP-1 sind erhöhte Serumspiegel mit der Adipositas¹³⁶ und dem Risiko, später einen Typ 2 Diabetes zu entwickeln, assoziiert¹¹⁰.

MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 α , CCL3) ist ein proinflammatorisches Chemokin, welches von Makrophagen und aktivierten neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sezerniert wird und die Einwanderung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten reguliert¹³⁷, was eine Rolle in der Wundheilung nahelegt. MIP-1 α scheint in die Pathogenese verschiedener immunmediierter Erkrankungen

wie der rheumatoiden Arthritis¹³⁸ oder der Multiplen Sklerose¹³⁹ involviert zu sein, eine Assoziation mit dem Typ 2 Diabetes ist nicht bekannt.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, CCL2) gehört wie MIP-1 α auch zur Gruppe der Chemokine. Es wird hauptsächlich von Monozyten sowie Endothelzellen, jedoch auch einer Vielzahl von mesenchymalen Zellen gebildet. Es wirkt vor allem auf Monozyten selbst, ferner auf dendritische Zellen, T-Gedächtniszellen und basophile Granulozyten¹⁴⁰. MCP-1 bewirkt z.B. in der atherosklerotischen Läsion die Einwanderung von Monozyten, welche sich im Verlauf zu Schaumzellen entwickeln können¹⁴¹. Auch wird für MCP-1 ein Einfluss auf die Entwicklung des metabolischen Syndroms und die Entwicklung der Insulinresistenz diskutiert^{116;142}. Zudem scheinen erhöhte Serumspiegel von MCP-1 ein Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes darzustellen¹¹⁰.

IP-10 (interferon-inducible protein 10, CXCL10) wird unter inflammatorischen Bedingungen von verschiedenen Zellen wie Monozyten, T-Lymphozyten oder Endothelzellen sezerniert und ist ein Schlüsselmediator in der Interferon-Antwort¹⁴³. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass IP-10 von Fettzellen konstitutiv exprimiert und sezerniert wird¹⁴⁴. IP-10 wirkt auf Monozyten und aktivierte T-Lymphozyten¹⁴⁵ und hemmt die Angiogenese¹⁴⁶, einen für die Wundheilung essentiellen Mechanismus. Eine gesteigerte IP-10-Expression findet sich bei einer Vielzahl von immunologisch getriggerten Krankheiten wie Atherosklerose¹⁴⁷ oder Multipler Sklerose¹⁴⁸. Erhöhte Serumspiegel von IP-10 scheinen ebenfalls ein Risikofaktor für das Auftreten eines Typ 2 Diabetes zu sein^{110;149}.

RANTES (Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted, CCL5) ist ein Chemokin, welches vor allem von T-Zellen, aber auch von Epithelzellen, Fibroblasten, Thrombozyten und Adipozyten exprimiert wird und die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen bewirkt¹⁵⁰. Es wird vermutet, dass RANTES ebenso die Infiltration von Leukozyten ins Fettgewebe mediiert¹⁵¹, was wiederum eine Veränderung der Insulinsensitivität zur Folge haben könnte. Über eine Funktion im Verlauf der Wundheilung ist nicht berichtet worden.

1.5. Akut-Phase-Proteine

Akut-Phase-Proteine sind Plasmaproteine, die in Folge von Entzündungsreaktionen in der Leber gebildet werden (sog. Akut-Phase-Reaktion). Mittlerweile werden über 30 Akut-Phase-Proteine unterschieden, unter ihnen Serumamyloid A, Haptoglobin, Coeruloplasmin, diverse Komplement-Faktoren sowie die hier in dieser Arbeit untersuchten CRP und Fibrinogen.

CRP (C-reaktives Protein) ist der klassische Entzündungsmarker in der klinischen Diagnostik entzündlicher Erkrankungen, ganz gleich ob infektiöser oder nicht-infektiöser Genese. Es wurde vor über 70 Jahren entdeckt¹⁵² und wird bei Entzündungsprozessen im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion von der Leber vermehrt synthetisiert, induziert durch IL-6 und verstärkt unter Einwirkung von IL-1 β ¹⁵³. Seine Wirkung ist bakterizid, indem es als Opsonin komplement-aktivierend wirkt¹⁵⁴.

In den letzten Jahren wurden erhöhte CRP-Spiegel als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie die Atherosklerose und KHK identifiziert, ebenso gilt dies für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes¹⁰¹.

Fibrinogen, dessen physiologische Wirkung im Bereich der sekundären Hämostase liegt, wird wie CRP zu den Akut-Phase-Proteinen gezählt. Es wird hauptsächlich von IL-6 induziert. Erhöhte Fibrinogen-Spiegel finden sich gehäuft bei Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten sowie dem Typ 2 Diabetes^{155;156}.

In dieser Arbeit wurden diejenigen Immunmarker näher untersucht, welche sowohl in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes als auch bei der chronischen Wundheilungsstörung eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

1.6. Ziel dieser Arbeit

Unter Berücksichtigung der zunehmenden gesundheitspolitischen Relevanz des diabetischen Fußsyndroms als schwerwiegende Komplikation des Typ 2 Diabetes und dessen bisher weitestgehend unverstandenen Pathomechanismus soll der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Bedeutung des Immunsystems für das diabetische Fußsyndrom liegen.

Ziel dieser Arbeit soll sein zu untersuchen,

1. inwieweit das Vorliegen eines diabetischen Fußsyndroms mit einer erhöhten systemischen Inflammation einhergeht,
2. welche klinischen Variablen Einfluss auf die Schwere des Fußsyndroms oder die Immunmarker haben,
3. ob die klinischen Parameter wie Wagner-Stadium oder Infektionsgrad sich im Immunmarker-Profil widerspiegeln sowie
4. ob und wie sich diese Inflammation im Verlauf der Heilung ändert.

Hierfür wurden bei 170 Diabetikern mit vorhandenem Fußsyndrom (im folgenden Patienten genannt) und bei 140 Diabetikern ohne diabetisches Fußsyndrom (im folgenden Kontrollen genannt) die systemischen Spiegel verschiedener Zytokine, Chemokine und Akut-Phase-Proteine mittels ELISA sowie Multiplex-Immunoassay analysiert und in Bezug zu den klinisch erhobenen Variablen gesetzt.

2. Material, Methoden und Studienkollektiv

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Blutentnahme

Surflo winged infusion set 22G x $\frac{3}{4}$ " (Terumo, Leuven, Belgien)
Membran Adapter Bn. 14.1112 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Citrat Plasmaröhrchen 4,9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
EDTA Plasmaröhrchen 4,9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Serumröhrchen 9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Einmalartikel

Micro Tubes Reagiergefäß 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, München)
Multiply Pro Tubes 0,2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Multiply Pro Tubes 0,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pipetten (5 ml bis 25 ml) (Falcon, Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl bis 1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

ELISA

96 Well Maxisorp® Nunc Immuno-Plates (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Eppendorfgefäße (0,2 ml; 0,5 ml und 1,5 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Folien, selbstklebend (Lab Systems, Los Angeles, USA)

Bead-basierter Multiplex-Immunoassay

MultiScreen 96-well filtration plate (Millipore Corp., Bedford, USA)

2.1.2. Geräte

Emax Microplate precision reader (Molecular Devices, München, Deutschland)
Feinwaage AC 88 Delta Range (Mettler, Gießen, Deutschland)
Waage MC1 LC4200 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Labor pH-Meter 340 pH/Temp Meter (Beckmann, Palo Alto, USA)

Luminex® 100 Analyzer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Magnetrührer (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
Nunc Immuno-Wash 8 (Nunc Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetus® akku (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)
Schüttler für Platten Titramax 1000 (Heidolph, Saarbrücken, Deutschland)
Tischzentrifuge Microspin FV 2400 (MolTech, Berlin, Deutschland)
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q UF Plus (Millipore, Molsheim, Frankreich)

2.1.3. Reagenzien

BSA (bovines Serumalbumin) #15K2357	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDC (Dimethylaminopropyl-Ethyl-Carbodiimide Hydrochlorid)	Pierce Chemicals, Rockford, USA
FCS (fötale Kälberserum)	PAA, Linz, Austria
PBS (phosphate buffered saline, 10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Milchpulver	Fluka, Buchs, Schweiz
NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)	Pierce Chemicals, Rockford, USA
Rattenserum	Perbio, Aalst, Belgien
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 pure	Serva, Heidelberg, Deutschland
TMB (Tetramethylbenzidin)	KemEnTec, Kopenhagen, Dänemark

2.1.4. ELISA

PeliKine compact ELISA Kit für IL-6, Kat.-Nr.: M1916 (Sanquin Reagents, Amsterdam, Niederlande)
DuoSet Human ELISA Kit für MIF, Kat.-Nr.: DY289 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
DuoSet Human ELISA Kit für RANTES, Kat.-Nr.: DY278 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.1.5. Bead-basierter Multiplex-Immunoassay

Luminex carboxylated microspheres Kat.-Nr.: 171-5060, microsphere codes 13, 21, 24, 26, 33, 35, 37, 40, 42, 46, 50, 52, 54, 58, 61 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

Primäre Antikörper

IL-1 α	Kat.-Nr.: MAB200 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-1 β	Kat.-Nr.: MAB601 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-2	Kat.-Nr.: MAB602 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-5	Kat.-Nr.: MAB405 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-8	Kat.-Nr.: MAB208 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-10	Kat.-Nr.: 55M1910 (Sanquin Reagents, Amsterdam, Niederlande)
IL-13	Kat.-Nr.: 55M1913 (Sanquin Reagents, Amsterdam, Niederlande)
IL-15	Kat.-Nr.: MAB647 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-17	Kat.-Nr.: MAB317 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-18	Kat.-Nr.: D044-3 (MBL International, Woburn, USA)
Interferon- γ	Kat.-Nr.: 551221 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
TNF- α	Kat.-Nr.: MAB610 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
MIP-1 α	Kat.-Nr.: MAB647 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
MCP-1	Kat.-Nr.: MAB679 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IP-10	Kat.-Nr.: MAB266 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

Sekundäre, biotinylierte Antikörper

IL-1 α	Kat.-Nr.: BAF200 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-1 β	Kat.-Nr.: BAF201 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-2	Kat.-Nr.: BAF202 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-5	Kat.-Nr.: BAM6051 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-8	Kat.-Nr.: BAF208 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-10	Kat.-Nr.: 55RM1910 (Sanquin Reagents, Amsterdam, Niederlande)
IL-13	Kat.-Nr.: BAF213 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-15	Kat.-Nr.: BAM247 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-17	Kat.-Nr.: BAF317 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-18	Kat.-Nr.: D045-3 (MBL International, Woburn, USA)
Interferon- γ	Kat.-Nr.: 554550 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
TNF- α	Kat.-Nr.: BAF210 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
MIP-1 α	Kat.-Nr.: BAF247 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
MCP-1	Kat.-Nr.: BAF279 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IP-10	Kat.-Nr.: BAF266 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

rekombinante Proteine

IL-1 α	Kat.-Nr.: 200-LA-010 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-1 β	Kat.-Nr.: 9511170 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
IL-2	Kat.-Nr.: 554603 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
IL-5	Kat.-Nr.: PHC0055 (Biosource, Camarillo, USA)
IL-8	Kat.-Nr.: 9515289 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
IL-10	Kat.-Nr.: 9515320 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
IL-13	Kat.-Nr.: 94/622 (NIBSC, Hertfordshire, UK)
IL-15	Kat.-Nr.: 247-IL-005 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-17	Kat.-Nr.: 317-IL-050 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IL-18	Kat.-Nr.: B001-5 (MBL International, Woburn, USA)
Interferon- γ	Kat.-Nr.: 9510130 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
TNF- α	Kat.-Nr.: 9511510 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
MIP-1 α	Kat.-Nr.: 9525339 (Strathmann, Hamburg, Deutschland)
MCP-1	Kat.-Nr.: 279-MC-010 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
IP-10	Kat.-Nr.: 266-010 (R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.1.6. Sterilisation der Chemikalien und Geräte

Glaswaren wurden bei 120 °C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Lösungen wurden durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 μm sterilisiert.

2.1.7. Stammlösungen und -puffer

Activation Buffer	0,1 M Natriumphosphat, pH 6,1
Blocking Reagent	500 μl Blocking Reagent Stocklösung (im jeweiligen Kit enthalten) ad 25 ml PBS (1x)
Storage Buffer	200 mg BSA und 0,2 g NaN_3 ad 200 ml PBS 1x
Coating Puffer (IL-6)	Lösung A: 1,24 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aqua dest. Lösung B: 1,68 g NaHCO_3 ad 300 ml Aqua dest. 70 ml von Lösung A mit Lösung B auf pH 9,6 einstellen Lagerung bei 4 °C für maximal 4 Wochen
Coating Puffer (MIF)	1,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 2,09 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 90 ml Aqua dest.

	auf pH 6,5 einstellen
	Lagerung bei 4°C für maximal 2 Wochen
Coating Puffer (RANTES)	PBS (1x)
DYdiluent	10 ml Serumverdünnungspuffer Konzentrat DY997 (enthält 10% Rattenserum)
	ad 100 ml PBS / 0,05 % Tween 20
EDC	10 mg EDC
	ad 200 µl Activation buffer
Milchpulver (0,5%)	5 g Milchpulver
	ad 1 L PBS (1x)
NHS	10 mg NHS
	ad 200 µl Activation buffer
PBS (1x)	100 ml PBS (10x)
	ad 1000 ml Aqua dest.
PBS / 1% BSA	10 g BSA
	ad 1000 ml PBS (1x) sterilfiltriert
	Lagerung bei -20°C
PBS / 10% FCS	100 ml FCS
	ad 1000 ml PBS (1x)
PBS / 0,05% Tween 20	500 µl 10% Tween 20
	Ad 1L PBS (1x)
Probenpuffer	20 ml HPE (5x) (im Kit enthalten)
	ad 80 ml Aqua dest.
Stopplösung (2N Schwefelsäure)	25 ml konzentrierte Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)
10% Tween 20	ad 450 ml Aqua dest.
	5g Tween 20 abwiegen
	ad 50 ml Aqua dest.
Waschpuffer ELISA	500 µl 10% Tween 20
	ad 1L PBS (1x)
Waschpuffer Multiplex	2,5 g BSA und
	625 µl Tween 20%
	ad 250 ml PBS (1x)

2.2. Methoden

2.2.1. Studienkollektiv

2.2.1.1. Rekrutierung und Blutentnahme

Die Rekrutierung der Patienten mit akutem diabetischem Fußsyndrom erfolgte bei stationärer Aufnahme zur Behandlung des diabetischen Fußsyndroms im Rahmen der Krankenversorgung an der Deutschen Diabetes-Klinik des Deutschen Diabetes-Zentrums in Düsseldorf. In dem Zeitraum von August 2003 bis November 2005 wurden konsekutiv insgesamt 282 Patienten mit akutem diabetischem Fußsyndrom rekrutiert, von denen im Verlauf ihres stationären Aufenthaltes jeweils bis zu drei Blutproben entnommen wurden. Diese umfassten jeweils ein Serum-, EDTA- und ein Citratröhrchen zur Bestimmung von klinisch-chemischen Basiswerten inklusive HbA1c, des Blutbildes, der basalen Gerinnungswerte sowie der Immunparameter. Die Entnahmen wurden am ersten Tag nach Aufnahme, und 7 bzw. 14 Tage nach erster Blutentnahme morgens nüchtern durchgeführt. Die Blutproben wurden innerhalb eines Zeitraums von maximal 60 Minuten weiter verarbeitet (Kapitel 2.2.1.2.). Alle Arbeiten fanden bei Raumtemperatur statt.

Die Rekrutierung von Patienten ohne diabetisches Fußsyndrom als Kontrollgruppe erfolgte im Rahmen von ärztlichen Konsultationen in der allgemeinen Ambulanz der Deutschen Diabetes-Klinik. Hier wurden im Zeitraum von Dezember 2003 bis September 2004 konsekutiv insgesamt 175 Diabetiker ohne diabetisches Fußsyndrom rekrutiert, von denen jeweils bei Vorstellungstermin im nüchternen Zustand eine Blutprobe, bestehend aus jeweils einem Serum-, EDTA und Citratröhrchen, zur klinischen Basisdiagnostik inkl. HbA1c-Wert und Bestimmung von Immunparametern entnommen wurde.

2.2.1.2. Weiterverarbeitung der Proben

Die entnommenen Serum- bzw. Citratröhrchen für die Bestimmung der Immunparameter wurden innerhalb von 60 Minuten bei 1560 g und Raumtemperatur zentrifugiert und in sechs Aliquots à 500 µl und vier Aliquots à 60 µl separiert. Diese wurden bei - 80°C bis zur weiteren Analyse der Immunparameter gelagert.

2.2.1.3. Klinisch-chemisches Routinelabor

Die Messung der klinisch-chemischen Parameter sowie der Gerinnung erfolgte mit den gängigen Referenzlabormethoden.

In der Patientengruppe wurden Gesamt-Cholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Gesamteiweiß, HbA1c, Differential-Blutbild sowie die Gerinnungsparameter aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) und Quick bestimmt. In der Kontrollgruppe wurden Gesamt-Cholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Kreatinin, Gesamteiweiß sowie HbA1c als auch die Gerinnungsparameter aPTT und Quick bestimmt.

Bei beiden Gruppen erfolgte zudem die Messung des hochsensitiven CRP (hsCRP) und des Fibrinogens im Plasma. Das hs-CRP wurde mit Hilfe eines hochsensitiven Latex-unterstützten nephelometrischen Assays auf dem BN II Analyser (Dade Behring, Marburg), das Fibrinogen wurde mit der gängigen Referenzlabormethode im Labor von Prof. W. Koenig an der Universitätsklinik in Ulm bestimmt, der uns die Daten freundlicherweise überlassen hat.

2.2.1.4. Klinische Patientencharakteristika

Die Erstellung der klinischen Datenbank erfolgte auf Basis der Krankenakten. Allgemeine, patientenbezogene Daten (Geburtsdatum, Diabetestyp, Aufnahme und Entlassdatum) sowie die verschiedenen klinischen Parameter (BMI, Blutdruck, Vorerkrankungen, aktuelle Medikation, etc.) wurden aus der Krankendokumentation entnommen. Die klinische Einschätzung des diabetischen Fußsyndroms nach Stadium und Infektionsgrad basierte auf der Verlaufs- sowie Fotodokumentation der hiesigen Fußambulanz. Nach Eingabe aller Daten wurde eine Plausibilitätstestung der Datenbank durchgeführt.

2.2.1.5. Klassifikation des Diabetes

Die Einteilung der Diabetestypen erfolgte nach der 2000 eingeführten und heute üblichen Klassifikation der Deutschen Diabetes Gesellschaft¹⁵⁷, wonach beim Diabetes mellitus vier Subtypen unterschieden werden.

1. Typ-1-Diabetes
2. Typ-2-Diabetes
3. andere spezifische Diabetes-Typen
4. Gestationsdiabetes

2.2.1.6. Klassifikation des Fußsyndroms

Die klinische Klassifikation des diabetischen Fußsyndroms erfolgt anhand der Stadieneinteilung nach Wagner/Armstrong, welche von Wagner im Jahre 1981 vorgeschlagen¹⁵⁸ und von Armstrong 1998 modifiziert wurde²⁴ (Tabelle 1).

Tabelle 1: Klassifikation des diabetischen Fußsyndroms nach Wagner (modifiziert nach Armstrong)

	0	1	2	3	4	5
A	prä- oder postulzerative Wunde	oberflächliche Wunde	Wunde bis zur Ebene von Sehne oder Kapsel	Wunde bis zur Ebene von Knochen oder Gelenk	Nekrose von Teilen des Fußes	Nekrose des gesamten Fußes
B	mit Infektion					
C	mit Ischämie					
D	mit Infektion und Ischämie					

Im Stadium 0 werden Patienten mit Hyperkeratosen sowie abgeheilte Ulzera subsumiert. Während im Stadium 1 lediglich oberflächliche Läsionen im Sinne einer Exkoriation zu beobachten sind, findet sich im Stadium 2 das Bild einer tiefergehenden, bis zur Ebene von Kapsel und Sehne reichenden Wunde. Im Stadium 3 reicht der Defekt bis auf die Knochen- und Gelenkebene, was häufig eine Osteomyelitis zur Folge hat. Das Stadium 4 beschreibt die partielle, Stadium 5 die komplette Nekrose des Fußes.

Nach Modifikation der Wagner-Klassifikation durch Armstrong werden die Stadien 0 bis 5 zusätzlich mit den Buchstabencodes A bis D versehen. A verneint hierbei eine bestehende Infektion bzw. Ischämie. B beschreibt das Vorliegen einer Infektion, C das Vorliegen einer arteriellen Minderperfusion im Rahmen einer gleichzeitig häufig bestehenden paVK. Die Eingruppierung D bezeichnet das gleichzeitige Vorhandensein einer Infektion sowie einer Ischämie.

2.2.1.7. Infektionsgrad

Um den Grad der Infektion weiter objektivieren zu können, wurde eine vierstufige Klassifikation angewandt. Bei Grad 0 bestand kein Hinweis für eine akute Entzündung, bei Grad 1 zeigte sich eine leichte Rötung der Wundumgebung, bei Grad 2 bestand eine deutliche Rötung bzw. ein Erysipel, während es bei Grad 3 zur Ausbildung einer Phlegmone mit oder ohne sichtbare Eiterbildung kam.

2.2.1.8. Hypertonie und Hyperlipidämie

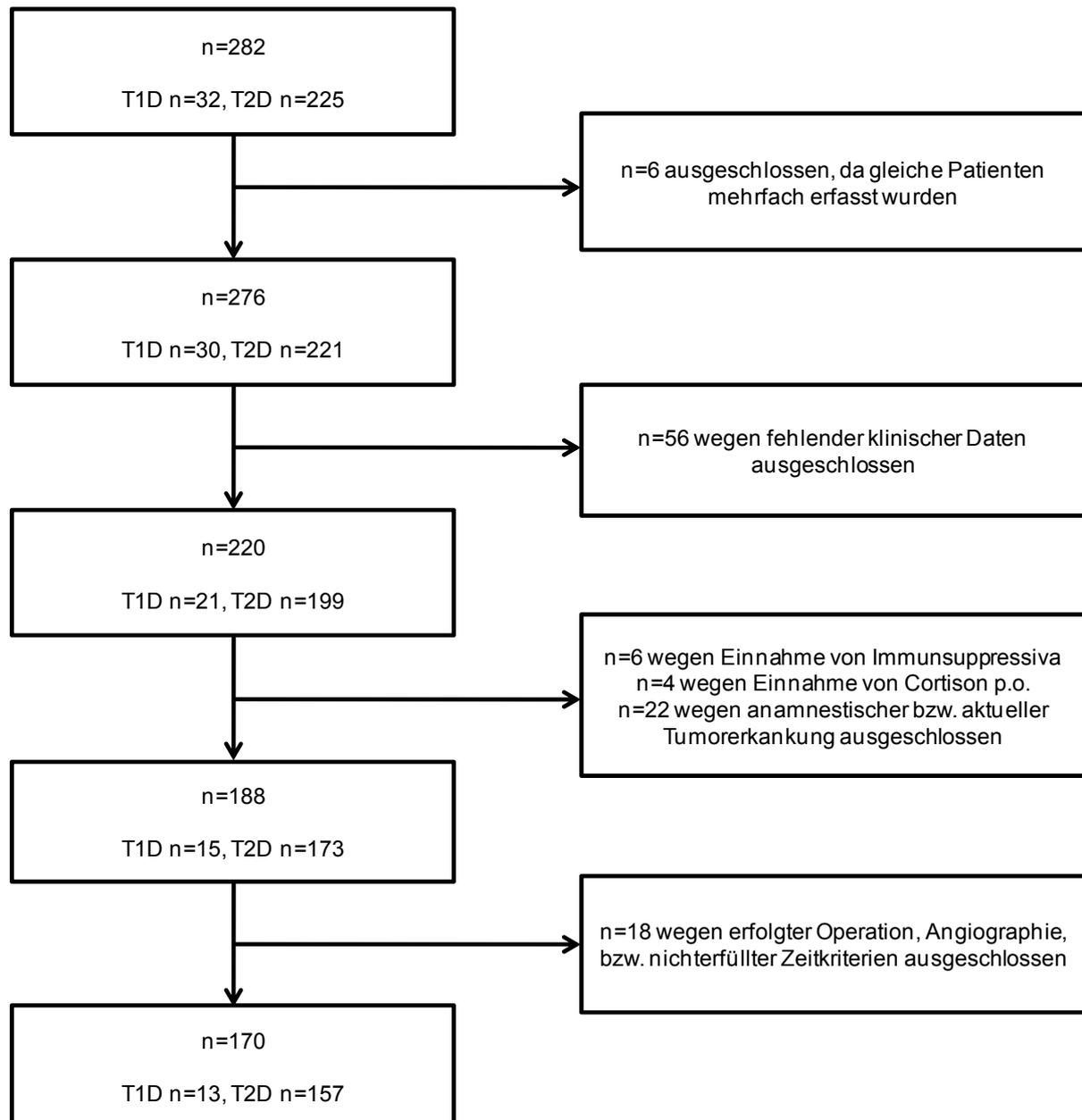
Eine arterielle Hypertonie wurde definiert als Vorliegen systolischer / diastolischer Blutdruck-Werte > 140 / 90 mmHg oder bei dokumentierter, regelmäßiger Einnahme von Calcium-Antagonisten, AT₁-Blockern oder Diuretika.

Eine Hyperlipidämie wurde definiert als Gesamt-Cholesterin-Spiegel > 200 mg/dl, LDL-Cholesterin-Spiegel > 120 mg/dl, Triglyzerid-Spiegel > 150 mg/dl oder bei Einnahme von Statinen oder Fibraten.

2.2.1.9. Erstellung der Analysedatenbank

Von den insgesamt 282 rekrutierten Patienten wurde 56 wegen fehlender, essentieller klinischer Daten von der Analyse ausgeschlossen (Abbildung 2). Hierbei fehlten entweder das Alter, der Diabetestyp oder das Wagner-Stadium. Ferner mussten insgesamt 32 Patienten wegen der Einnahme von immunmodulierenden Pharmaka wie peroralem Cortison (n=4) oder gängiger Immunsuppressiva (n=6) bzw. anamnestischer oder aktueller Tumorerkrankungen, die ebenfalls zu Alterationen des Immunsystems führen¹⁵⁹, ausgeschlossen werden. Weiter wurden insgesamt 18 Patienten ausgeschlossen, bei denen entweder die Blutentnahmen nicht innerhalb der vorher definierten Intervalle von 5 bis 9 Tagen bzw. 12 bis 16 Tagen nach Aufnahme erfolgte, und solche Patienten, die sich vor der Blutentnahme einer Angiographie oder Operation unterziehen ließen. Zusätzlich mussten 6 weitere Patienten ausgeschlossen werden, da diese mehrfach aufgenommen wurden. Am Ende dieser Selektion gingen somit insgesamt 170 Patienten in die Auswertung ein, davon 13 Typ 1 Diabetiker und 157 Typ 2 Diabetiker.

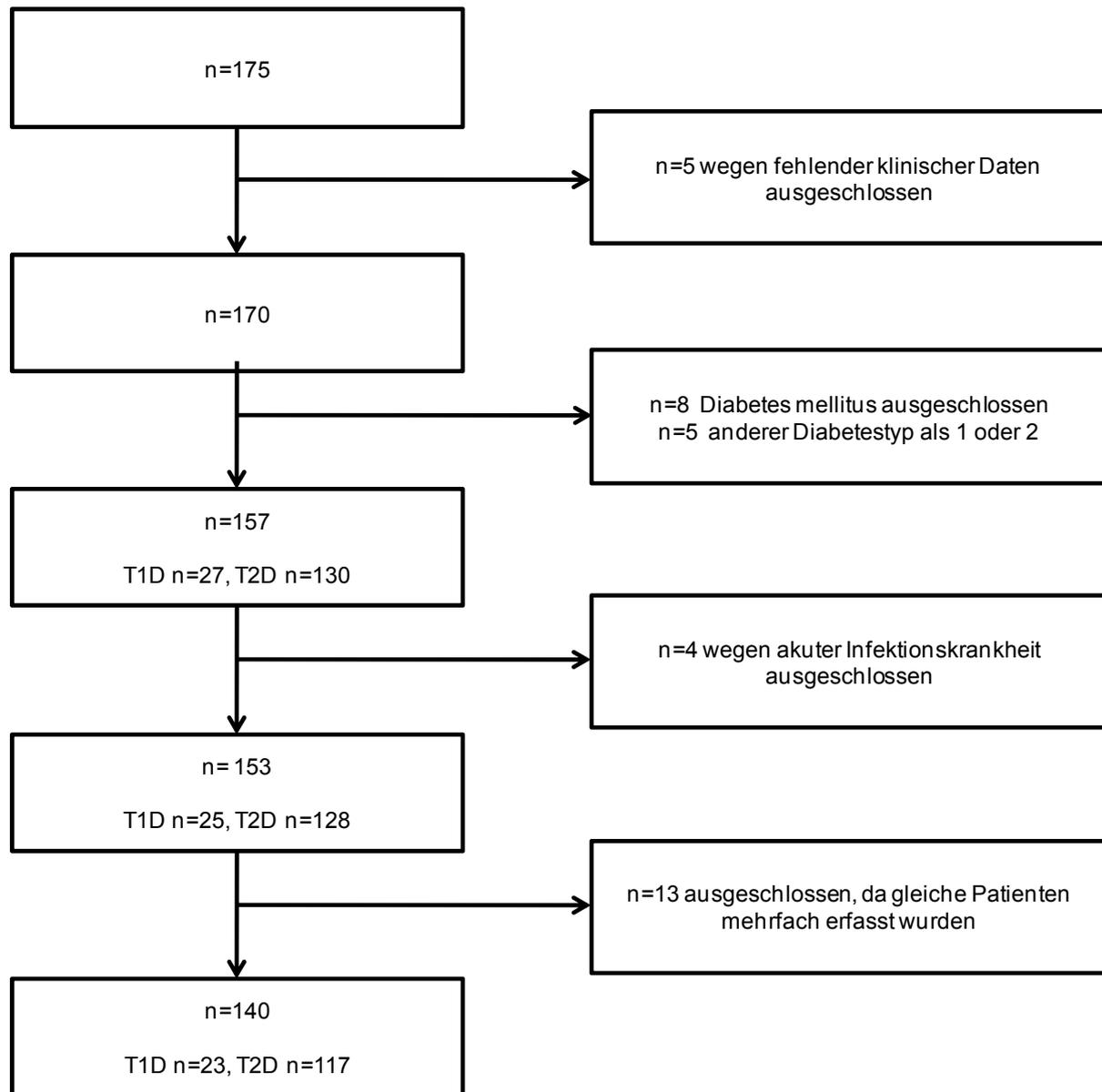
Abbildung 2: Flussdiagramm Patientenkollektiv



T1D = Typ 1 Diabetiker; T2D = Typ 2 Diabetiker; p.o. = peroral

Von den insgesamt 175 Kontrollen wurden 5 wegen fehlender essentieller klinischer Daten ausgeschlossen (Abbildung 3). Weitere 8 Kontrollen wurden ausgeschlossen, da sich ein Diabetes mellitus nicht bestätigen ließ oder ein anderer Diabetestyp als Typ 1 oder Typ 2 vorlag (n=5). Zusätzlich mussten 4 Kontrollen wegen Vorliegens einer akuten Infektionskrankheit und 13 weitere Kontrollen wegen mehrfacher Aufnahme ausgeschlossen werden. Somit wurden 140 Kontrollen berücksichtigt, davon 23 Typ 1 Diabetiker und 117 Typ 2 Diabetiker. In die endgültige Auswertung gingen somit insgesamt 170 Patienten und 140 Kontrollen ein.

Abbildung 3: Flussdiagramm Kontrollkollektiv



T1D = Typ 1 Diabetiker; T2D = Typ 2 Diabetiker

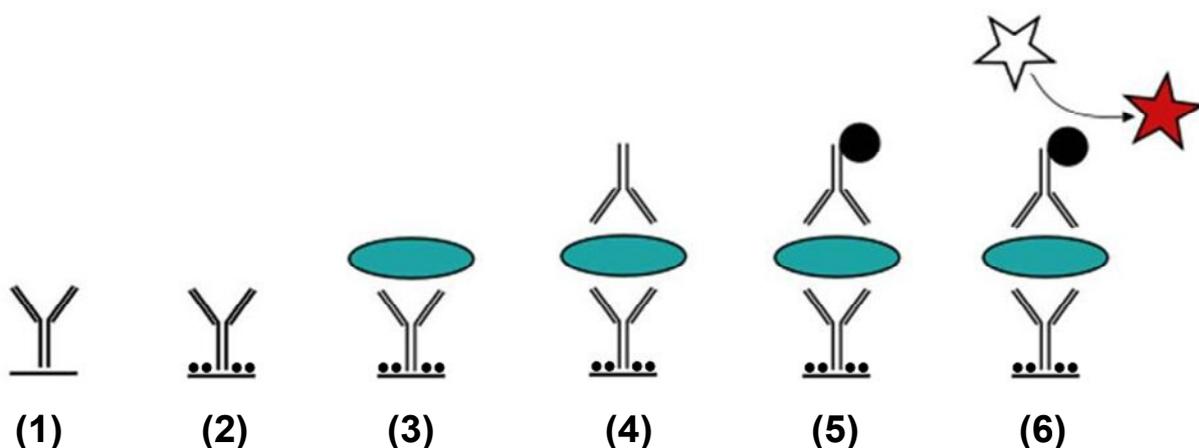
2.2.2. Analyse der Immunparameter

2.2.2.1. ELISA

Im Rahmen der Konzentrationsbestimmung von löslichen Analyten wurde der sogenannte „Sandwich“-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) verwendet. Bei dieser Methode werden Antikörper und Analyt in der Art eines Sandwichs geschichtet (Abbildung 4). Die erste Schicht des ELISA bildet ein Antikörper, der den Analyt spezifisch bindet. Dieser primäre Antikörper wird an die Plastikoberfläche einer ELISA-Platte gekoppelt. Dazu wird der Antikörper in definierter Konzentration in die vorhandenen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Im nächsten Schritt wird

die Platte mit einer Proteinlösung geblockt, um unspezifische Bindungen des Analyten, des sekundären Antikörpers oder des Enzymkonjugats an die Plastikoberfläche zu verhindern. Die darüberliegende Schicht bildet der Analyt. Die Platte wird mit dem Analyten inkubiert, welcher nun an den ersten Antikörper bindet. Anschließend wird der Platte der sekundäre Antikörper hinzugefügt, der den Analyt ebenfalls spezifisch, aber an anderen Epitopen bindet. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit Biotin gekoppelt. An das Biotin kann in einem weiteren Schritt ein Streptavidin-Enzymkomplex binden, der ein geeignetes chromogenes Substrat (z.B. TMB) in einer Enzymreaktion zu einem Farbstoff umsetzt. Da die Bindung des zweiten Antikörpers und somit auch des Enzymkomplexes an den Analyten spezifisch ist, lassen sich Rückschlüsse auf die Menge des Analyten ziehen. Die Geschwindigkeit des Farbumschlages der Enzymreaktion ist proportional zu der Menge des gebundenen Analyten. Demzufolge führen höhere Konzentrationen des Analyten zu einem schnelleren Farbumschlag. Diese Reaktion folgt bis zu einem gewissen Punkt einer linearen Kinetik. Die Farbreaktion kann durch Zugabe einer Stopplösung (z.B. 2N Schwefelsäure) beendet und durch eine photometrische Messung die Farbreaktion quantitativ bestimmt werden. Wird die Reaktion in der linearen Phase gestoppt, kann anhand einer Standardverdünnungsreihe mit definierten Mengen des Analyten eine Eichkurve erstellt werden, mittels derer die Menge des vorhandenen Analyten in der Probe bestimmt werden kann.

Abbildung 4: Schematischer Ablauf eines ELISA



Die Nummerierung bezieht sich auf das unten aufgeführte, allgemeine ELISA-Protokoll. Dargestellt ist die Oberfläche der mit primären Antikörper beschichteten ELISA-Platte (1), das Blocking Reagent (2), der nachzuweisende Analyt (3), der sekundäre Antikörper (4), das Enzym (5), und die Farbreaktion (6)

2.2.2.2. Generelles Protokoll für Zytokin-ELISA

1. Beschichtung mit primären Antikörper

Der den Analyten spezifisch bindende Antikörper wurde mit einer speziellen Pufferlösung aus einer Stocklösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Im Anschluss wurde die Lösung in die Vertiefungen einer ELISA-Platte (Nunc MaxiSorp Immuno-Plates) pipettiert. Die Platte wurde 24 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Zum Schutz vor Verunreinigungen und Verdunstung wurde die Platte mit Klebefolie abgedeckt. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit PBS(1x) gewaschen, um ungebundenen primären Antikörper zu entfernen.

2. Blocken

Um unspezifische Bindungen des Zytokins, des sekundären Antikörpers oder des Enzymsubstrats zu verhindern, wurde die Platte im Folgenden mit Blocking Reagent für zwei Stunden inkubiert. Dazu wurden 250 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

3. Auftragen von Standard und Proben

Zur Herstellung einer Standardreihe wurde ein Aliquot der Stocklösung bestehend aus rekombinantem humanem Zytokin in Probenpuffer seriell verdünnt. Auch die Proben wurden in Probenpuffer verdünnt. Danach wurden Proben und Standard in die Vertiefungen der ELISA-Platte aufgetragen, die Platte mit Klebefolie bedeckt und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, um ungebundene Proteine zu entfernen.

4. Sekundärer Antikörper

Der mit Biotin konjugierte Detektionsantikörper wurde aus einer Stocklösung mit Probenpuffer verdünnt und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Darauf folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer, wodurch ungebundener Antikörper entfernt wurde.

5. Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats

Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde mit Probenpuffer verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Danach folgte eine 30minütige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, an die sich dreimaliges Waschen mit Waschpuffer anschloss.

6. Chromogene Reaktion des Enzymkomplexes

Nach Zugabe des chromogenen Substrats TMB wurde durch das zuvor gebundene Streptavidin-Peroxidase-Konjugat eine Umwandlung des farblosen Substrats in einen blauen Farbstoff erzielt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung für 30 Minuten. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe der Stopplösung und Denaturierung der Peroxidase beendet, um im linearen Bereich der Reaktion zu bleiben. Durch die Zugabe der Stopplösung (2N Schwefelsäure) erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb.

7. Photometrische Messung

Die Messung der Farbreaktion erfolgte mittels eines Microplate-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Standardkurve wurde durch Log-Log-Interpolation mit Hilfe der SOFTmax-Software (Version 2.35) erstellt und anhand dieser Kurve die Mengen des jeweiligen Zytokins unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung in der Probe bestimmt. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung gemessen und daraus der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient (CV) errechnet.

2.2.2.3. ELISA-Protokoll für IL-6

Detektionsgrenze: 0,2 pg/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper wurde 1:100 mit Coating Puffer verdünnt. In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 50 µl pipettiert.

2. Blocken

In jede Vertiefung wurden je 250 µl des Blocking Reagent pipettiert.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste einen Bereich von 150 – 0,62 pg/ml. Die Proben wurden 1:2 im Probenpuffer des ELISA-Kits verdünnt. In die Vertiefungen der ELISA-Platte wurden jeweils 50 µl pipettiert.

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:200 verdünnt. In die Vertiefungen wurden 50 µl sekundärer Antikörper pipettiert.

6. Bindung des HRP-Streptavidin-Enzymkomplexes

Die HRP-Streptavidin-Enzymkomplex-Stocklösung (im Kit enthalten) wurde 1:10.000 in Probenpuffer verdünnt. In jedes Well wurden 100 µl der Lösung pipettiert.

7. Farbreaktion

In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 100 µl 4°C kaltes TMB-Substrat pipettiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) beendet.

2.2.2.4. ELISA-Protokoll für MIF

Detektionsgrenze: 20,48 ng/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper wurde 1:180 mit Coating Puffer verdünnt. In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 100 µl pipettiert.

2. Blocken

In jede Vertiefung wurden je 250 µl 10 % FCS / PBS als Blocking Reagent pipettiert.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste einen Bereich von 2.000 – 20,48 ng/ml. Die Proben wurden 1:25 in 10% FCS / PBS verdünnt. In die Vertiefungen der ELISA-Platte wurden jeweils 50 µl pipettiert.

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:180 verdünnt. In die Vertiefungen wurden 100 µl sekundärer Antikörper pipettiert.

5. Bindung des HRP-Streptavidin-Enzymkomplexes

Die HRP-Streptavidin-Enzymkomplex-Stocklösung (im Kit enthalten) wurde 1:3.000 in Probenpuffer verdünnt. In jedes Well wurden 100 µl der Lösung pipettiert.

6. Farbreaktion

In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 100 µl 4°C kaltes TMB-Substrat pipettiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) beendet.

2.2.2.5. ELISA-Protokoll für RANTES

Detektionsgrenze: 4,11 ng/ml

1. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper wurde 1:360 mit PBS (1x) als Coating Puffer verdünnt. In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 100 µl pipettiert.

2. Blocken

In jede Vertiefung wurden je 250 µl 1%BSA/PBS als Blocking Reagent pipettiert.

3. Auftragen von Standard und Proben

Die Standardreihe umfasste einen Bereich von 1.000 – 4,11 ng/ml. Die Proben wurden 1:500 in 1% BSA / PBS verdünnt. In die Vertiefungen der ELISA-Platte wurden jeweils 50 µl pipettiert.

4. Sekundärer Antikörper

Der sekundäre Antikörper wurde in Probenpuffer aus der Stocklösung 1:360 verdünnt. In die Vertiefungen wurden 100 µl sekundärer Antikörper pipettiert.

5. Bindung des HRP-Streptavidin-Enzymkomplexes

Die HRP-Streptavidin-Enzymkomplex-Stocklösung (im Kit enthalten) wurde 1:200 in Probenpuffer verdünnt. In jedes Well wurden 100 µl der Lösung pipettiert.

6. Farbreaktion

In jede Vertiefung der ELISA-Platte wurden 100 µl 4°C kaltes TMB-Substrat pipettiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) beendet.

2.2.2.6. Auswertung der ELISA-Platten

Die Auswertung aller ELISA-Platten durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines ELISA-Readers. Anhand der Standardverdünnungsreihe wurde eine Eichkurve durch die Log-Log-Interpolation erstellt. Anhand dieser Eichkurve ließen sich die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine ermitteln.

2.2.2.7. Qualitätskontrolle und Normalisierung der ELISA-Platten

Um die Varianz zwischen den einzelnen Platten bei den Messungen von Patienten und Kontrollen vergleichbar zu halten, wurden auf einer Platte sowohl Patienten- wie Kontrollproben gemessen.

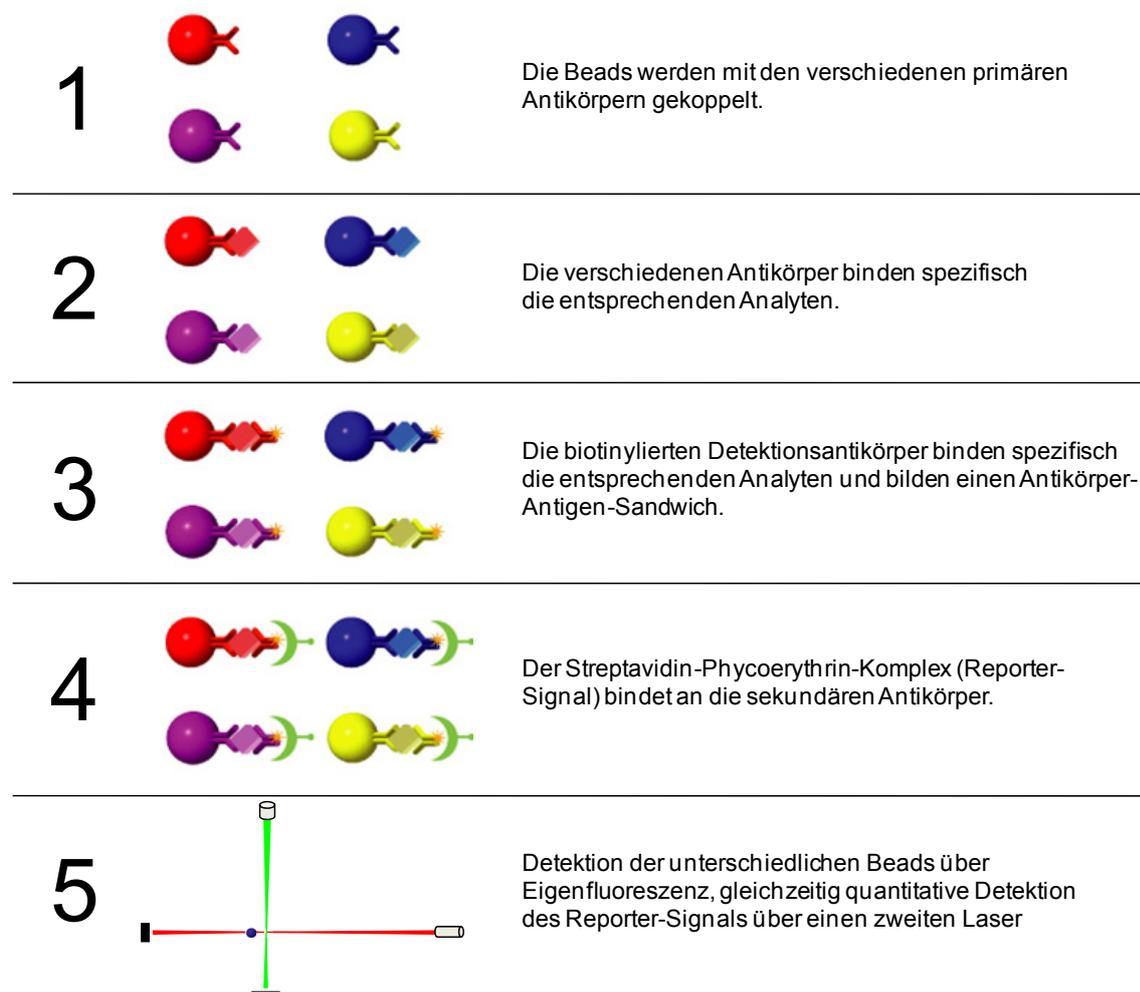
Die Interassayvariabilität wurde anschließend durch die Analyse von mitgeführten Kontrollseren bestimmt. Bei insgesamt drei Platten des MIF-ELISA und bei einer Platte des RANTES-ELISA wurden sowohl in den Kontrollseren als auch bei allen Proben systematisch niedrigere Extinktionen als bei den restlichen 23 MIF- bzw. 25 RANTES-ELISA-Platten gemessen, die zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der anderen Platten abwichen. Die Proben der abweichenden Platten wurden anhand eines Faktors umgerechnet, der aus der Abweichung des jeweiligen Medians der Proben der Platte zum Gesamtmedian aller Platten errechnet wurde. Damit wurde eine gemeinsame Analyse der gemessenen Zytokinwerte ermöglicht.

2.2.2.8. Bead-basierter Multiplex Immunoassay (Luminex®)

Im Gegensatz zum klassischen Sandwich-ELISA, wo man sich auf die Messung eines Analyten beschränken muss, erlaubt die Multiplex-Methode die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung mehrerer löslicher Analyten innerhalb einer Patientenprobe. Beim sogenannten Bead-basierten Multiplex Immunoassay (MIA) wird eine zum Sandwich-ELISA analoge Schichtung aus Antikörper und Analyten auf einer Polystyrol-Mikrosphäre („bead“) aufgebaut (Abbildung 5). Dabei werden pro zu messendem Analyten ca. 750 bis 1.000 Mikrosphären verwendet. In die

Mikrosphären sind zwei durch den roten Laser im Detektionsgerät anregbare Fluorochrome in unterschiedlichen Anteilen eingebettet, so dass bis zu 100 verschiedene Farbtöne generiert werden können, die eine Unterscheidung einzelner Mikrosphären erlauben. So wird der primäre Antikörper gegen den nachzuweisenden Analyten nur an Mikrosphären einer einzigen, bekannten Fluorochromzusammensetzung gebunden.

Abbildung 5: Schematischer Ablauf des bead-basierten Multiplex-Immunoassays



Der rote Laser erkennt aufgrund der verschiedenartigen Farbtöne die verschiedenen Mikrosphären, während der grüne Laser das Reporter-Signal (Phycoerythrin) zur quantitativen Messung auf Einzelbeadniveau detektiert.

2.2.2.9. Protokoll für die Kopplung des primären Antikörpers an die Mikrosphären

Eine Voraussetzung für die Durchführung des Multiplex-Immunoassays ist die Kopplung der primären Antikörper an die Mikrosphären. Hierbei werden die Antikörper kovalent an die Oberfläche der aus Polystyrol bestehenden Mikrosphären gebunden.

Anfangs werden die Mikrosphären zwei Minuten in einem Ultraschallbad suspendiert, um eventuell verklumpte Mikrosphären voneinander zu lösen. Ein Aliquot von 250 µl (entspricht ca. 3×10^6 Mikrosphären) wird bei 14.000 g dreimal in Folge zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend jeweils vorsichtig abpipettiert. Nach Resuspendieren der Mikrosphären in 80 µl Aktivierungspuffer (0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 6,1) wird zuerst 10 µl NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid), dann 10 µl EDC (Dimethylaminopropyl-Ethyl-Carbodiimid Hydrochlorid) hinzugegeben. Das EDC reagiert mit auf den Mikrosphären vorliegenden Carboxyl-Gruppen zu einem instabilen Zwischenprodukt, an das die Antikörper binden können. NHS wiederum stabilisiert dieses Zwischenprodukt. Anschließend wird 20 Minuten im Dunklen auf dem Schüttler bei 750 rpm inkubiert. Nun wird erneut dreimal in Folge zentrifugiert und der entstehende Überstand abpipettiert. Die aktivierten Mikrosphären werden mit 250 µl Kopplungspuffer (PBS 1x) vermischt und für 30 Sekunden im Ultraschallbad resuspendiert, um Verklebungen der Mikrosphären zu vermeiden. Anschließend werden 50 µg des zu koppelnden Antikörpers hinzugegeben und über Nacht bei 750 rpm und 4°C auf dem Schüttler im Dunklen inkubiert. Nach Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes folgt ein Waschschrift mit 250 µl Waschpuffer (PBS / 0,05% Tween). Das entstehende Gemisch wird für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen auf dem Schüttler inkubiert. Hierauf folgt ein erneuter Waschgang mit 250 µl Waschpuffer, und danach mit 250 µl Storage buffer, wobei die Mikrosphären nochmals durch Ultraschall voneinander getrennt werden. Nach Hinzugeben von 1 ml storage buffer werden die Mikrosphären in der Neubauer-Kammer gezählt und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ / ml eingestellt. Die Qualität der durchgeführten Kopplung lässt sich nun anhand der Messung einer Standardkurve im Multiplex-Gerät überprüfen.

2.2.2.10. Generelles Protokoll für Multiplex-Immunoassay

Nach Aufbringen des Standards, der Kontrollen und der Proben auf eine Millipore MultiScreen 96-well Filterplatte werden die entsprechenden mit Antikörpergekoppelten Mikrosphären hinzugegeben, so dass es zu einer spezifischen Antikörper-Analyt-Bindung auf der Oberfläche der Mikrosphären kommt. Analog zum ELISA wird dann in einem zweiten Schritt ein Gemisch der Detektionsantikörper hinzugegeben. An die sekundären Antikörper ist kovalent Biotin gekoppelt, welches im nächsten Schritt an einen Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex (Streptavidin-PE) mit Phycoerythrin als Fluoreszenzfarbstoff (Reportersignal) bindet. Der Luminex-Reader differenziert und klassifiziert jede Mikrosphäre ähnlich der Durchflusszytometrie in einer Kapillare anhand deren spezifischer Eigenfluoreszenz. Zusätzlich wird durch den zweiten, grünen Laser das Fluoreszenz-Reportersignal detektiert, welches nicht mit dem Klassifikationssignal der Mikrosphären interferiert. Hierüber geschieht die Quantifikation des gebundenen Analyten.

Diese Methode wurde zum Nachweis der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , MCP-1 und IP-10 angewandt.

2.2.2.11. Protokoll für Multiplex-Immunoassay

1. Vorbereiten und Auftragen der Standardkurve

Die benötigten rekombinanten Proteine werden in DY-Verdünnungspuffer entsprechend einer Konzentration von 5.000 pg/ml aufgelöst. Zur Herstellung der Standardreihe wurde ein Aliquot dieser Stocklösung seriell 1:2 verdünnt. Nach Anfeuchten der Luminex-Platte (MultiScreen 96-well Filterplatte) durch Aufbringen von 100 μ l HPE-Puffer in jede Vertiefung sowie anschließender Entfernung des Gemischs durch Vakuumfiltration werden 50 μ l jedes Standards auf die Luminex-Platte aufgebracht.

2. Vorbereiten und Auftragen der Proben

Es werden 25 μ l DY-Verdünnungspuffer in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Danach werden 25 μ l der Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert, so dass die Proben 1:2 verdünnt werden. Anschließend wird die Platte für 5 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

3. Vorbereiten und Auftragen der mit Antikörper-gekoppelten Mikrosphären

Die mit Antikörper gekoppelten Mikrosphären werden in einem Mikrosphärenmix zusammengefasst. Nach mindestens einminütigem Vortexen des Mikrosphärenmix zur Trennung aggregierter Mikrosphären werden hiervon jeweils 10 µl (je Analyt 1.000 Mikrosphären pro Vertiefung) in jede Vertiefung der Luminex-Platte aufgetragen. Diese wird anschließend auf dem Schüttler für eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Sekundäre Antikörper

Die Detektionsantikörper werden 1:30 in HPE-Puffer aufgenommen und miteinander in einer Stocklösung vermischt. Hiervon wird pro Vertiefung 10 µl hinzugegeben, woraufhin die Platte erneut auf dem Schüttler für eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert wird. Anschließend erfolgt die Entfernung des Gemisches durch Vakuumfiltration, an die sich ein Waschvorgang mit 150 µl Waschpuffer sowie erneuter Vakuumfiltration anschließt. Hierbei werden nur die ungebundenen Antikörper entfernt, da die ca. 6 µm großen Mikrosphären durch die 1,2 µm großen Poren der MultiScreen-Filterplatte zurückgehalten werden.

5. Bindung des Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats

Das Streptavidin-PE-Konjugat (1 mg/ml) wird 1:200 mit HPE-Puffer verdünnt. Hiervon wurden je 50 µl auf die Platte aufgetragen. Daraufhin wird die Platte auf dem Schüttler für 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt wiederum ein Waschvorgang mit 150 µl Waschpuffer und Entfernung der Pufferlösung durch Vakuumfiltration.

6. Messung

Anschließend werden die Mikrosphären durch die Zugabe von 100 µl HPE-Puffer in jede Vertiefung resuspendiert und die Platte kann nach fünfminütigem Schütteln im Luminex-Reader gemessen werden.

2.2.2.12. Auswertung der Luminex-Platten

Die Auswertung aller Luminex-Platten erfolgte mit der Bio-Plex Manager 4.0™ Software. Anhand der aus der Stocklösung hergestellten Standardverdünnungsreihe

wurde pro Analyt eine Eichkurve durch 5-Parameter-Interpolation berechnet. Anhand dieser Eichkurve ließ sich die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine ermitteln.

Die gemessenen Konzentrationen mehrerer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- γ , TNF- α) lagen unterhalb der jeweiligen Detektionslimits, woraus eine nicht ausreichende, d.h. nicht repräsentative Probenanzahl resultierte: bei IL-1 α lagen 37%, bei IL-1 β 90%, bei IL-2 60%, bei IL-5 56%, bei IL-10 69%, bei IL-13 69%, bei IL-15 61%, bei IL-17 65%, bei IFN- γ 64% und bei TNF- α 70% unterhalb des niedrigsten Standardwertes. Aus diesem Grund wurden in die Auswertung ausschließlich die Zytokine IL-8, IL-18, MCP-1, MIP-1 α und IP-10 miteinbezogen. Hierbei fanden sich 86% bis 99% der gemessenen Werte oberhalb des Detektionslimits.

2.2.2.13. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Luminex-Platten

Um die Varianz zwischen den einzelnen Platten bei den Messungen von Patienten und Kontrollen vergleichbar zu halten, wurden wie bei ELISA-Messungen auf einer Platte sowohl Patienten- wie Kontrollproben gemessen.

Die Interassayvariabilität wurde anschließend durch die Analyse der mitgeführten Kontrollseren bestimmt. Da bei einigen Platten sowohl in den Kontrollseren als auch bei allen Proben systematisch unterschiedliche Fluoreszenzen gemessen wurden, die zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der anderen Platten abwichen, wurden alle Proben anhand eines Faktors umgerechnet, der aus der Abweichung des jeweiligen Medians der Proben der Platte zum Gesamtmedian aller Platten errechnet wurde. Damit wurde eine gemeinsame Analyse der gemessenen Zytokinwerte ermöglicht.

2.2.3. Computerprogramme

Die Bearbeitung der Messungen des ELISA-Readers erfolgte mit Hilfe des Programms SOFTmax® Version 2.35 (Molecular Devices GmbH, Graefelfing, Deutschland) für Windows 98 (Microsoft, Verl, Deutschland). Die Umrechnung der Daten erfolgte in Excel® Version 2002 SR-1 für Windows (Microsoft, Verl, Deutschland). Die Bearbeitung der Messungen des Luminex-Gerätes erfolgte unter Verwendung des Programms Bio-Plex Manager™ Software 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

Statistische Auswertungen sowie die graphische Darstellung der Daten wurden mit Hilfe der Programme GraphPad Prism® Version 4.2 (GraphPad Software Incorporation, San Diego, USA) sowie mit SAS Version 9.1 TS Level 1M3 (SAS Inc., Carey, USA) erstellt. Die klinische Datenbank wurde mit Hilfe von Microsoft Access 2003 (Microsoft, Verl, Deutschland) verwaltet.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Daten und Patientencharakteristika

3.1.1. Alters- und Geschlechterverteilung

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über allgemeine, klinische und laborchemische Charakteristika der in der Arbeit untersuchten Patienten und Kontrollen. Sofern nicht anders erwähnt, beruhen die Analysen auf Patienten mit Typ 1 und Patienten mit Typ 2 Diabetes.

Bei den in die Auswertung eingegangenen 170 Patienten handelte es sich um 13 Typ 1 Diabetiker (9M / 4F) und 157 Typ 2-Diabetiker (91M / 66F). Das mediane Alter aller Patienten betrug 67 Jahre. Bei den Typ 2 Diabetikern betrug das mediane Alter 68 Jahre, bei den Typ 1 Diabetikern 49 Jahre. Die insgesamt 140 Kontrollen setzten sich aus 117 Typ 2 Diabetikern (66M / 51F) und 23 Typ 1-Diabetikern (10M / 13F) zusammen. Hier betrug das mediane Alter insgesamt 62 Jahre, das mediane Alter der Typ 2 Diabetiker 63 Jahre, das der Typ 1 Diabetiker 39 Jahre. Die Kontrollen waren sowohl bei den Typ 1 als auch bei den Typ 2 Diabetikern signifikant jünger als die Patienten mit diabetischen Fußsyndrom ($p < 0,0001$).

Betrachtet man allein die Typ 2 Diabetiker, wurde die Grunderkrankung Diabetes bei den Patienten häufiger als bei den Kontrollen mit Insulin (64% vs. 27%) und seltener mit oralen Antidiabetika (22% vs. 58%) behandelt ($p < 0,0001$). Eine Kombination aus oralen Antidiabetika und Insulintherapie erhielten 9% der Patienten und 5% der Kontrollen. Bei 5% der Patienten und 9% der Kontrollen wurde der Diabetes rein diätetisch behandelt.

Im durchschnittlichen Body-Mass-Index (BMI) unterschieden sich beide Gruppen nicht. Der BMI des Patientenkollektivs betrug $29,6 \pm 6,3 \text{ kg/m}^2$, der des Kontrollkollektivs $29,9 \pm 5,6 \text{ kg/m}^2$. Es bestand kein signifikanter Unterschied und somit lag der Großteil der Patienten beider Studiengruppen im Bereich der Präadipositas bzw. Adipositas Grad I. Berücksichtigt man nur die Typ 2 Diabetiker, kommt ein gering signifikanter Unterschied heraus: Die Kontrollen hatten einen geringgradig höheren BMI ($29,5 \pm 6,6$ vs. $31,0 \pm 5,1$).

Tabelle 2: Übersicht über die Patientencharakteristika (links alle Studienteilnehmer, rechts nur Typ 2 Diabetiker)

	n	Patienten	Kontrollen	p-Wert		n	Patienten	Kontrollen	p-Wert
Anzahl [n]	310	170	140	-	Anzahl [n]	274	157	117	-
Typ 1/2 Diabetes [n]	310	13 / 157	23 / 117	0,02 ⁺	Typ 1/2 Diabetes [n]	274	0 / 157	0 / 117	-
Alter [Jahre] ^b	310	67 [59;75]	62 [52;69]	<0,0001 [#]	Alter [Jahre] ^b	274	68 [61;75]	63 [55;69]	<0,0001 [#]
Geschlecht [m/w] ^a	310	100 / 70	76 / 64	ns ⁺	Geschlecht [m/w] ^a	274	91 / 66	66 / 51	ns ⁺
BMI [kg/m ²] ^a	294	29,3 ± 6,6	29,9 ± 5,4	ns*	BMI [kg/m ²] ^a	260	29,5 ± 6,6	31,0 ± 5,1	0,044*
RR syst [mmHg] ^a	264	134 ± 19	142 ± 22	0,003*	RR syst [mmHg] ^a	239	135 ± 19	144 ± 21	0,0009*
RR diast [mmHg] ^a	264	73 ± 10	78 ± 10	0,0005*	RR diast [mmHg] ^a	239	74 ± 11	80 ± 9	<0,0001*
Cholesterin [mg/dl] ^a	289	188 ± 50	208 ± 42	0,0007*	Cholesterin [mg/dl] ^a	256	188 ± 52	209 ± 44	0,0004*
HDL-Chol. [mg/dl] ^a	278	46 ± 15	50 ± 16	0,024*	HDL-Chol. [mg/dl] ^a	245	46 ± 15	47 ± 13	ns*
LDL-Chol. [mg/dl] ^a	278	114 ± 42	123 ± 36	ns*	LDL-Chol. [mg/dl] ^a	245	113 ± 42	124 ± 38	0,032*
Triglyzeride [mg/dl] ^b	290	146 [104;190]	157 [95;224]	ns [#]	Triglyzeride [mg/dl] ^b	257	144 [103;187]	178 [107;250]	0,006 [#]
HbA1c [%] ^c	301	7,64 ± 1,58	8,27 ± 1,58	0,0006*	HbA1c [%] ^c	267	7,52 ± 1,49	8,45 ± 1,55	<0,0001*
Neuropathie ^c	307	149 (88%)	75 (54%)	<0,0001 ⁺	Neuropathie ^c	271	138 (88%)	66 (56%)	<0,0001 ⁺
paVK ^c	307	113 (66%)	13 (9%)	<0,0001 ⁺	paVK ^c	271	106 (68%)	12 (10%)	<0,0001 ⁺
Retinopathie ^c	308	126 (74%)	22 (16%)	<0,0001 ⁺	Retinopathie ^c	272	115 (73%)	15 (13%)	<0,0001 ⁺
Nephropathie ^c	305	113 (67%)	47 (33%)	<0,0001 ⁺	Nephropathie ^c	269	108 (69%)	41 (35%)	<0,0001 ⁺
KHK ^c	306	67 (39%)	27 (19%)	<0,0001 ⁺	KHK ^c	270	64 (41%)	25 (21%)	<0,0001 ⁺
Hypertonie ^c	308	154 (91%)	105 (75%)	<0,0001 ⁺	Hypertonie ^c	272	145 (92%)	98 (84%)	0,016 ⁺
Hyperlipidämie ^c	305	132 (78%)	112 (80%)	ns ⁺	Hyperlipidämie ^c	269	123 (78%)	99 (85%)	ns ⁺
Diabetestherapie ^c	303	-	-	<0,0001 ⁺	Diabetestherapie ^c	267	-	-	<0,0001 ⁺
Diät		8 (5%)	12 (9%)		Diät		8 (5%)	11 (9%)	
OAD		33 (20%)	68 (48%)		OAD		33 (22%)	68 (58%)	
OAD+Insulin		13 (8%)	6 (4%)		OAD+Insulin		13 (9%)	6 (5%)	
Insulin		109 (67%)	54 (39%)		Insulin		96 (64%)	32 (27%)	

BMI: body mass index; KHK: koronare Herzkrankheit; ns: nicht signifikant ($p > 0,05$); OAD: orale Antidiatika (hierunter fielen Sulfonylharnstoffe, Glinide, Biguanide, Insulinsensitizer); paVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit. Als arterielle Hypertonie wurden systolische / diastolische Blutdruck-Werte $> 140 / 90$ mmHg, oder die Einnahme von Calcium-Antagonisten, AT1-Blockern oder Diuretika klassifiziert. Eine Hyperlipidämie lag bei Gesamt-Cholesterin > 200 mg/dl, LDL > 120 mg/dl, Triglyzeride > 150 mg/dl oder bei Einnahme von Statinen oder Fibraten vor. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die jeweilige Gesamtanzahl an Patienten bzw. Kontrollen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung (symbolisiert durch ^a), Median und 25./75. Perzentilen (symbolisiert durch ^b) bzw. Häufigkeitsverteilung^c. Die Gruppenvergleiche erfolgten mit dem t-Test*, Mann-Whitney[#]- bzw. Fischer-Test⁺.

3.1.2. Häufigkeit von Begleiterkrankungen

Als häufigste Komorbidität wurde sowohl in der Kontrollgruppe (n=75; 54%) als auch in der Patientengruppe (n=149; 88%) die diabetische Polyneuropathie festgestellt. Die ätiologisch für das diabetische Fußsyndrom bedeutsame periphere arterielle Verschlusskrankheit war deutlich häufiger im Kollektiv der Patienten zu finden (74% vs. 16%; $p < 0,0001$). Beim Vergleich der anderen Diabetes-assoziierten Erkrankungen wie der diabetischen Nephro- und Retinopathie sowie der koronaren Herzkrankheit fiel auf, dass das Patientenkollektiv insgesamt deutlich häufiger betroffen war (jeweils $p < 0,0001$). Dieser signifikante Unterschied blieb bestehen, wenn man die Typ 1 Diabetiker aus der Analyse ausschloss.

Eine Hyperlipidämie war in beiden Gruppen nicht unterschiedlich verteilt (alle Studienteilnehmer 78% vs. Typ 2 Diabetiker 80%), während sich bei den Patienten (91%) eine arterielle Hypertonie signifikant häufiger ($p < 0,0001$) fand als bei den Kontrollen (75%).

3.2. Vergleich der Immunmediatoren von Patienten vs. Kontrollen

Die Patienten mit diabetischem Fußsyndrom zeigten im Vergleich zu den Kontrollen bei Aufnahme eine signifikante Erhöhung der beiden gemessenen Akut-Phase-Proteine C-reaktives Protein (11,7 [3,3; 38,2] vs. 2,4 [1,0; 5,0] mg/l; $p < 0,0001$; Abbildung 6) und Fibrinogen ($5,5 \pm 1,6$ vs. $3,8 \pm 0,9$ g/l; $p < 0,0001$). Ebenso zeigten die Patienten mit diabetischem Fußsyndrom gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Serumspiegel von Interleukin-6 (12,4 [6,9; 30,3] vs. 3,8 [2,2; 5,2] pg/ml; $p < 0,0001$), MIF (7,7 [5,6; 11,9] vs. 4,7 [3,1; 6,6] ng/ml; $p < 0,0001$), MIP-1 α (82,6 [54,6; 132,7] vs. 61,2 [44,1; 107,4] pg/ml; $p < 0,0078$) sowie IP-10 (419,8 [310,0; 543,0] vs. 299,4 [217,0; 402,0] pg/ml; $p < 0,0001$). RANTES hingegen war bei den diabetischen Fußpatienten signifikant erniedrigt ($76,9 \pm 38,2$ vs. $100,3 \pm 44,7$ ng/ml; $p < 0,0001$).

Die Serumspiegel von IL-8, IL-18 und MCP-1 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Tabelle 3 bietet eine Übersicht über alle gemessenen Akut-Phase-Proteine und Zytokine.

Tabelle 3: Vergleich der Immunmediatoren

	Patienten	Kontrollen	p-Wert
hs-CRP [mg/l] ^b	11,7 [3,3;38,2]	2,4 [1,0;5,0]	<0,0001 [#]
Fibrinogen [g/l] ^a	5,5 ± 1,6	3,8 ± 0,9	<0,0001 [*]
IL-6 [pg/ml] ^b	12,4 [6,9;30,3]	3,8 [2,2;5,2]	<0,0001 [#]
MIF [ng/ml] ^b	7,7 [5,6;11,9]	4,3 [3,1; 6,6]	<0,0001 [#]
IL-18 [pg/ml] ^b	118,3 [84,2;179,0]	122,7 [85,0;172,0]	ns [#]
IL-8 [pg/ml] ^b	11,4 [7,1;18,3]	10,0 [6,8;15,9]	ns [#]
MIP-1α [pg/ml] ^b	82,6 [54,6;132,7]	61,2 [44,1;107,4]	<0,008 [#]
MCP-1 [pg/ml] ^b	291,0 [202,2;381,9]	303,3 [213,8;415,6]	ns [#]
IP-10 [pg/ml] ^b	419,8 [309,9;543,4]	299,4 [216,9;401,6]	<0,0001 [#]
RANTES [ng/ml] ^a	76,9 ± 38,2	100,3 ± 44,7	<0,0001 [*]

Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung (symbolisiert durch ^a), Median und 25./75. Perzentile (symbolisiert durch ^b). Die Gruppenvergleiche erfolgten mit dem t-Test* bzw. Mann-Whitney-Test[#].

Abbildung 6: Vergleich Immunmediatoren Patienten vs. Kontrollen

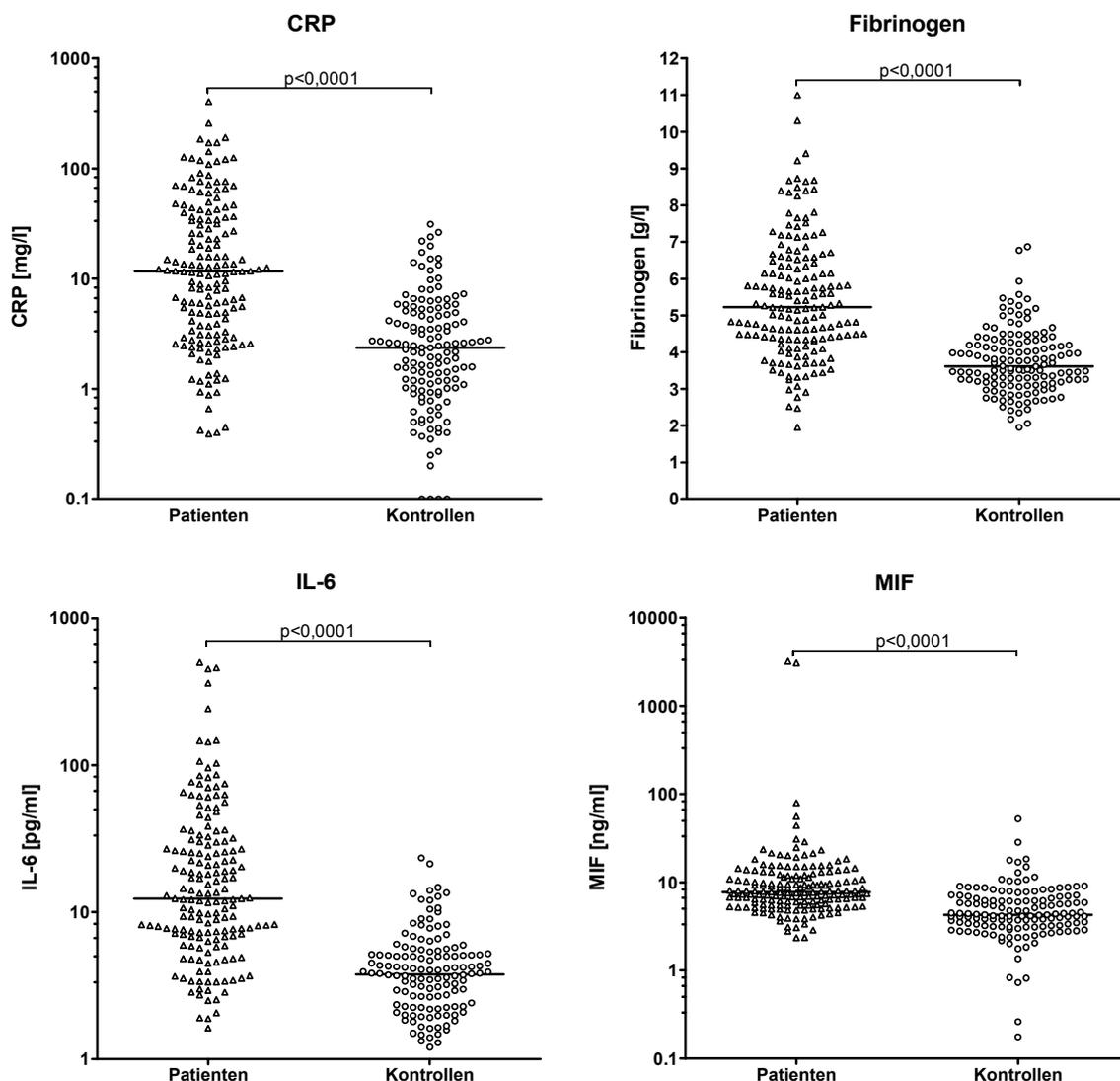
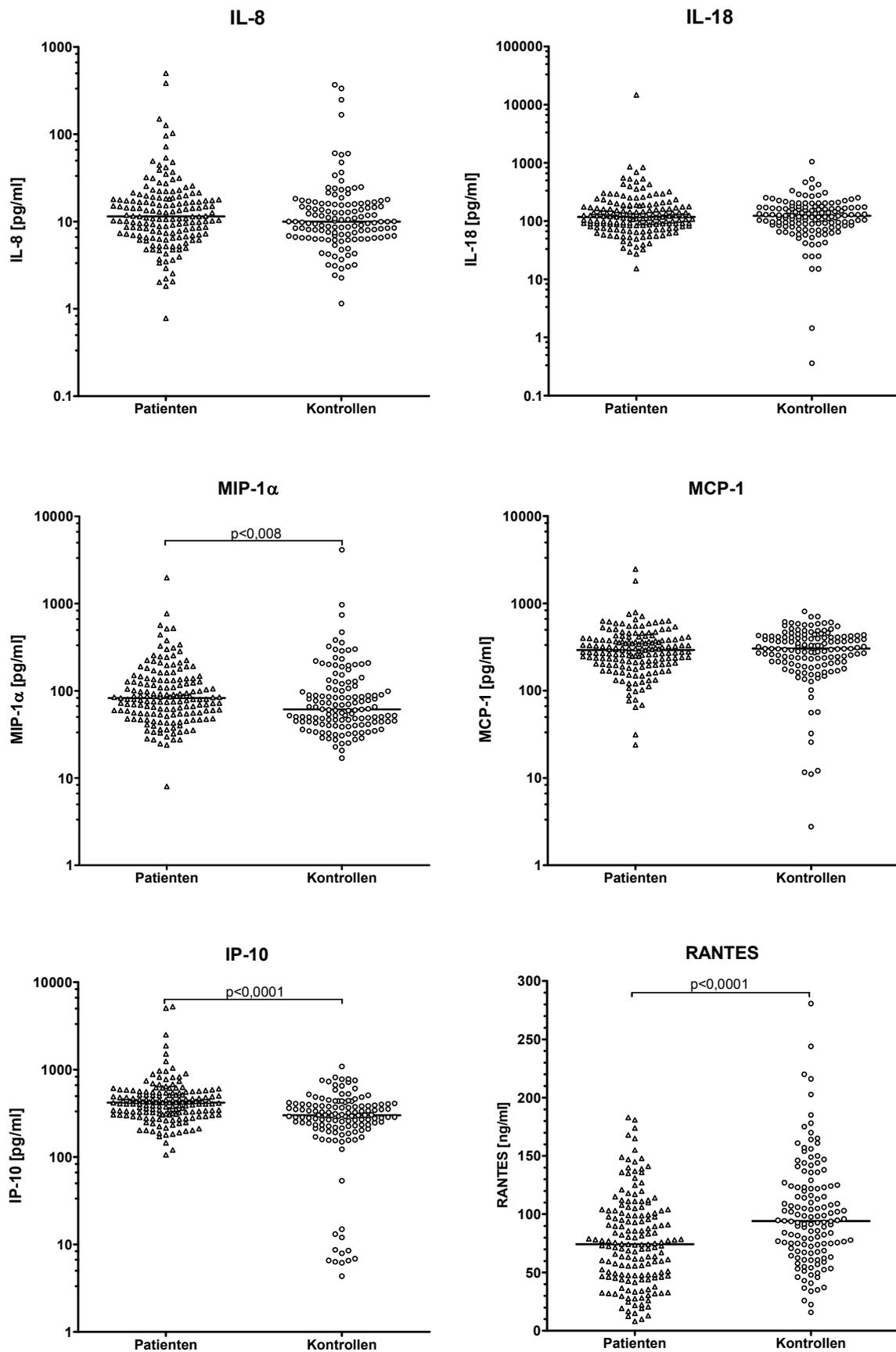


Abbildung 6 (fortgesetzt)



Der Balken symbolisiert den jeweiligen Median. Jedes Symbol entspricht einem Individuum.

3.2.1. Korrelationen der Immunmediatoren untereinander

Nahezu alle signifikanten Korrelationen sind positiv. Im Patientenkollektiv kann man drei verschiedene Muster der Immunmediatoren erkennen: Eine Gruppe um die Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen sowie die Zytokine IL-6 und MIF, zwischen denen eine erwartungsgemäß starke und deutlich signifikante Korrelation besteht (Tabelle 4). Zum anderen die Gruppe des Zytokins IL-18 und der Chemokine IL-8 und IP-10, die signifikant miteinander korrelieren. IL-8 und IL-18 korrelieren zusätzlich noch mit CRP und IL-6, nicht aber mit Fibrinogen.

Bei den Kontrollen liegt wie auch bei den Patienten eine starke und deutlich signifikante Korrelation der Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen sowie IL-6 vor. Eine Korrelation von MIF mit anderen Immunmediatoren wie bei den Patienten ist nicht zu beobachten. Ebenso wenig besteht eine Korrelation von IL-8, IL-18 und IP-10 wie beim Patientenkollektiv.

Tabelle 4: Korrelationen der Immunmediatoren untereinander

Patienten										
	CRP	Fibr	IL-6	MIF	IL-18	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	IP-10	RANTES
CRP	1									
Fibr	0,72***	1								
IL-6	0,78***	0,59***	1							
MIF	0,26**	0,21**	0,25***	1						
IL-18	0,22**	0,02	0,17*	0,08	1					
IL-8	0,19*	0,09	0,29***	0,01	0,40***	1				
MIP-1 α	-0,01	0,01	-0,06	0,07	0,08	0,10	1			
MCP-1	-0,003	-0,12	-0,01	-0,001	0,19*	0,20*	0,14	1		
IP-10	-0,01	-0,10	0,03	-0,07	0,24**	0,36***	0,17*	0,05	1	
RANTES	-0,01	0,14	-0,07	-0,05	0,03	-0,11	-0,06	-0,002	-0,09	1

Kontrollen										
	CRP	Fibr	IL-6	MIF	IL-18	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	IP-10	RANTES
CRP	1									
Fibr	0,51***	1								
IL-6	0,45***	0,43***	1							
MIF	0,01	0,10	0,16	1						
IL-18	0,02	0,004	0,01	0,02	1					
IL-8	0,07	0,16	0,26**	-0,08	0,11	1				
MIP-1 α	0,09	0,14	0,03	0,14	0,11	0,00	1			
MCP-1	0,04	0,10	0,14	0,01	0,25**	0,43***	-0,12	1		
IP-10	0,14	0,06	-0,02	-0,14	0,12	0,17	0,33***	0,01	1	
RANTES	0,06	0,06	0,09	0,04	-0,13	0,12	0,02	-0,05	-0,20*	1

Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten (r) nach Spearman sowie die statistische Signifikanz: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001; Fibr: Fibrinogen

3.2.2. Regressionsmodelle

Um zu prüfen, ob die in Tabelle 3 dokumentierten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Immunmediatoren durch potentielle Confounder wie anthropometrische oder metabolische Parameter erklärt werden können oder unabhängig von diesen sind, wurde eine lineare Regression mit unterschiedlichen Regressionsmodellen berechnet. Eine Übersicht über die verschiedenen Modelle ermöglicht Tabelle 5. Im einfachen Modell (Modell 0) wurde lediglich auf den Diabetes-Typ adjustiert, in Modell 1 auch auf Alter und Geschlecht. In Modell 2a wurde zusätzlich auf die metabolische Kovariablen (BMI, HbA1c, Hyperlipidämie) und Hypertonie adjustiert, in Modell 2b hingegen auf Diabetes-assoziierte Folgeerkrankungen (paVK, Neuropathie, KHK). Modell 3 berücksichtigt alle genannten Kovariablen. Zusätzlich wurden die Regressionsmodelle statt mit Adjustierung auf Diabetes-Typ nur für das Stratum Typ 2 Diabetes berechnet. Hier zeigten sich nahezu identische Ergebnisse.

In Modell 0 zeigen sich die gleichen Befunde wie in Tabelle 2, es bestehen signifikante Unterschiede der Serum- bzw. Plasmaspiegel zwischen Patienten und Kontrollen für die Parameter CRP, Fibrinogen, IL-6, MIF, IP-10 und RANTES, der Diabetes-Typ hat hierauf keinen Einfluss. In den Modellen 1 bis 3 sind die Regressionskoeffizienten und p-Werte auch bei Adjustierung stabil, d.h. die Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen sind unabhängig von den berücksichtigten Kovariablen.

Tabelle 5: Regressionsmodelle des Vergleichs Patienten (1. Blutentnahme) vs. Kontrollen

alle Studienteilnehmer

Variable / Modell	Modell 0: DM-Typ		Modell 1: Modell 0 + Alter, Geschlecht		Modell 2a: Modell 1 + BMI, HbA1c, Hypertonus, Hyperlipidämie		Modell 2b: Modell 1 + paVK, Neuropathie, KHK		Modell 3: volles Modell	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
CRP	1,59	<0,0001	1,59	<0,0001	1,66	<0,0001	1,70	<0,0001	1,74	<0,0001
Fibrinogen	0,34	<0,0001	0,33	<0,0001	0,35	<0,0001	0,32	<0,0001	0,35	<0,0001
IL-6	1,58	<0,0001	1,50	<0,0001	1,48	<0,0001	1,51	<0,0001	1,47	<0,0001
MIF	0,70	<0,0001	0,69	<0,0001	0,70	<0,0001	0,76	<0,0001	0,75	<0,0001
IL-18	0,13	0,17	0,14	0,16	0,15	0,15	0,20	0,075	0,22	0,077
IL-8	0,08	0,45	0,00	1,00	-0,01	0,94	-0,05	0,70	-0,04	0,79
MIP-1 α	0,17	0,072	0,22	0,0227	0,23	0,0276	0,33	0,0027	0,35	0,0029
MCP-1	0,06	0,49	0,03	0,74	0,03	0,73	0,10	0,31	0,06	0,53
IP-10	0,61	<0,0001	0,53	<0,0001	0,57	<0,0001	0,49	<0,0001	0,51	<0,0001
RANTES	-0,31	<0,0001	-0,31	<0,0001	-0,29	<0,0001	-0,28	<0,0001	-0,28	0,0004

nur Typ 2 Diabetiker

Variable	Modell 0: nicht adjustiert		Modell 1: Modell 0 + Alter, Geschlecht		Modell 2a: Modell 1 + BMI, HbA1c, Hypertonus, Hyperlipidämie		Modell 2b: Modell 1 + paVK, Neuropathie, KHK		Modell 3: volles Modell	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
CRP	1,57	<0,0001	1,60	<0,0001	1,64	<0,0001	1,69	<0,0001	1,68	<0,0001
Fibrinogen	0,32	<0,0001	0,32	<0,0001	0,34	<0,0001	0,31	<0,0001	0,33	<0,0001
IL-6	1,61	<0,0001	1,50	<0,0001	1,52	<0,0001	1,51	<0,0001	1,50	<0,0001
MIF	0,68	<0,0001	0,74	<0,0001	0,76	<0,0001	0,78	<0,0001	0,78	<0,0001
IL-18	0,16	0,13	0,17	0,12	0,19	0,11	0,25	0,0440	0,25	0,053
IL-8	0,13	0,26	0,04	0,72	0,04	0,78	-0,03	0,85	-0,02	0,88
MIP-1 α	0,14	0,15	0,22	0,032	0,19	0,076	0,32	0,0051	0,30	0,014
MCP-1	0,08	0,40	0,05	0,63	0,04	0,73	0,12	0,29	0,06	0,62
IP-10	0,64	<0,0001	0,53	<0,0001	0,57	<0,0001	0,50	<0,0001	0,53	<0,0001
RANTES	-0,31	<0,0001	-0,30	<0,0001	-0,28	0,0003	-0,29	0,0004	-0,27	0,0015

Angegeben sind die Regressionskoeffizienten β sowie die zugehörigen p-Werte. Alle Immunmediatoren sind als logarithmierte Werte (ln) in die Modelle eingegangen.

3.3. Lokalisation der Ulzera und Infektionsgrad

Die Verteilung des bei den Patienten am Aufnahmetag vorliegenden diabetischen Fußsyndroms nach der Wagner-Klassifikation sah wie folgt aus (Tabelle 6): Mit 61 Patienten (36%) war das Stadium 2 das am häufigsten diagnostizierte Wagner-Stadium. Bei 37 Patienten (22%) wurde ein Stadium 4, bei 36 Patienten (21%) wurde ein Stadium 3 diagnostiziert, ein Stadium 1 lag bei 32 Patienten (19%) vor. Stadium 5 wurde nur bei 1 Patienten (<1%), Stadium 0 nur bei 3 Patienten (2%) festgestellt.

Bei 88 Patienten (52%) bestand ein Infektionsgrad 3, bei 46 Patienten (27%) konnte ein Stadium 2 diagnostiziert werden. Bei 24 Patienten (14%) lag lediglich ein Stadium 1 vor, bei 12 Patienten (7%) dagegen bestanden keine klinischen Zeichen einer Infektion. Bei 47 Patienten (27%) lag zusätzlich eine Osteomyelitis vor, deren Vorliegen wie zu erwarten mit höhergradigen Wagner-Stadien assoziiert war.

Die häufigste Lokalisation des Ulkus lag bei 58 Patienten (34%) an den Zehen, bei 49 Patienten (29%) im Bereich des Vorfußes. Bei 17 Patienten (10%) lagen die Ulzera im Bereich des Unterschenkels, bei 10 Patienten (6%) an der Ferse. In 30 Fällen (18%) fanden sich an einer Extremität multiple Ulzera, in 5 Fällen (3%) an beiden Füßen Ulzera.

Für alle drei Variablen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung, wenn man die Typ 1 Diabetiker von der Analyse ausschloss.

Tabelle 6: klinische Charakteristika der Ulzera

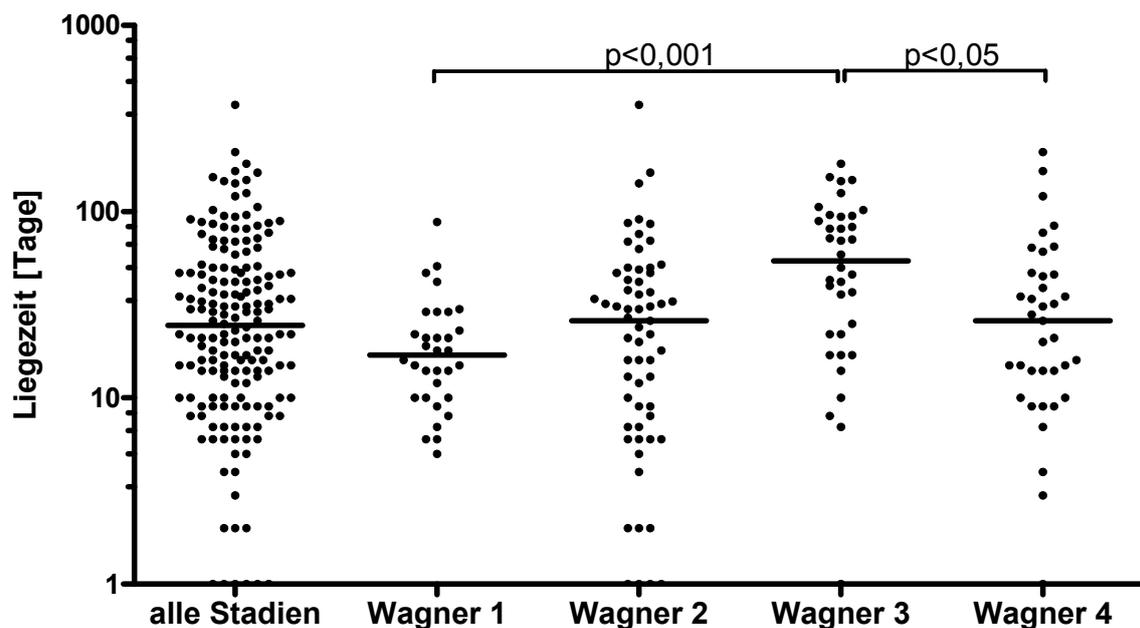
	Typ 1 + Typ 2	nur Typ 2	p-Wert
Klassifikation n.Wagner			1
Stadium 0	3 (2%)	3 (2%)	
Stadium 1	32 (19%)	29 (18%)	
Stadium 2	61 (36%)	58 (37%)	
Stadium 3	36 (21%)	32 (20%)	
Stadium 4	37 (22%)	34 (21%)	
Stadium 5	1 (<1%)	1 (<1%)	
Infektionsgrad			0,98
Grad 0	12 (7%)	10 (6%)	
Grad 1	24 (14%)	23 (15%)	
Grad 2	46 (27%)	41 (26%)	
Grad 3	88 (51%)	83 (53%)	
Lokalisation			1
Zehen	58 (34%)	51 (33%)	
Vorfuß	49 (29%)	47 (30%)	
Ferse	10 (6%)	9 (6%)	
Unterschenkel	17 (10%)	15 (9%)	
multiple Ulzera	30 (18%)	29 (19%)	
beidseitig	5 (3%)	5 (3%)	

Angegeben ist die Anzahl (Prozent an allen Patienten) in der Gesamtgruppe und den Typ 2 Diabetikern. Auf Unterschiede in der Verteilung wurde mit dem χ^2 -Test geprüft, die p-Werte sind angegeben.

3.4. Schwere des diabetischen Fußsyndroms und klinische Variablen

Die Liegezeit (Median, 25. und 75. Perzentile) der Patienten mit diabetischem Fußsyndrom betrug 26 [10; 50] Tage. Wie Abbildung 7 zeigt, ist die Liegezeit mit der Schwere des Fußulkus assoziiert. Während Patienten mit einem Wagner-Stadium 1 eine Liegezeit von 17 [10; 29] Tagen zeigten, verblieben Patienten mit einem diabetischen Fußsyndrom im Wagner-Stadium 2 27 [8; 48] Tage, im Wagner-Stadium 3 50 [22; 95] Tage in stationärer Behandlung. Im Stadium 4 sank die Verweildauer wiederum auf 26 [12; 47] Tage ab. Aufgrund der geringen Anzahl wurden Patienten im Wagner-Stadium 0 und 5 (3 bzw. 1 Patient) nicht berücksichtigt.

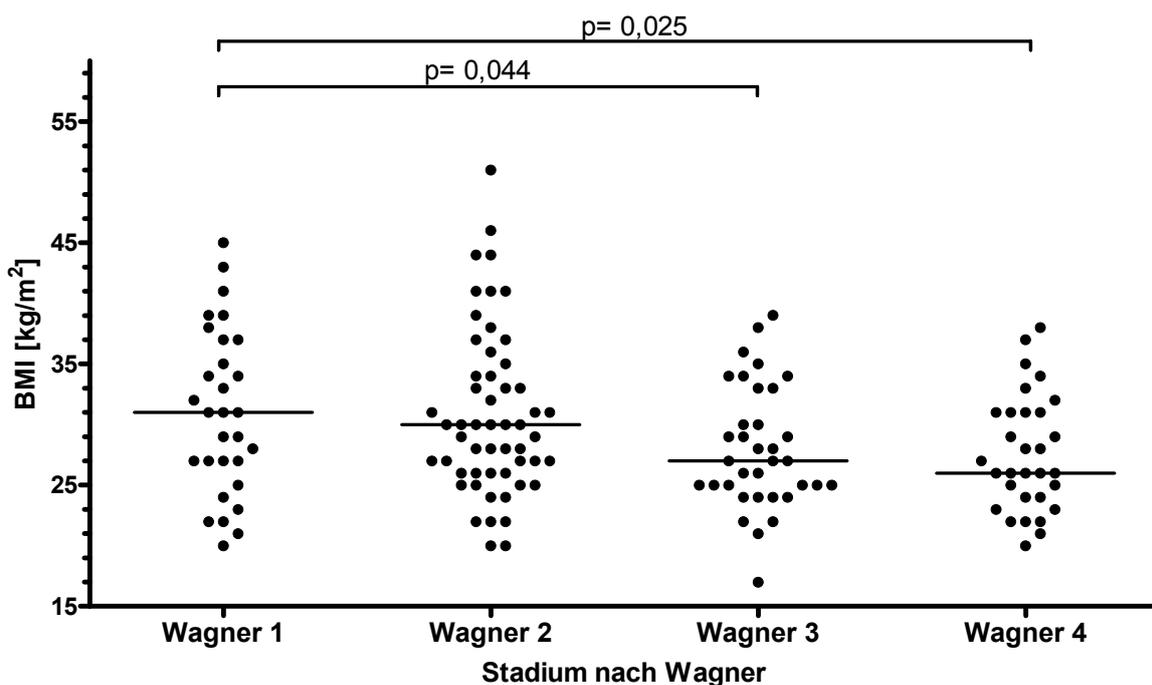
Abbildung 7: Vergleich Wagner-Stadium und Liegezeit



Jeder Punkt entspricht einem Individuum, die Balken entsprechen den jeweiligen Medianen. Patienten in Wagner-Stadium 0 bzw. 5 wurden aufgrund geringer Fallzahlen nicht dargestellt. Getestet wurde mit Kruskal-Wallis und Dunn's multiplem Vergleichstest.

Zusätzlich zeigte sich eine inverse Assoziation der Schwere des diabetischen Fußsyndroms mit dem BMI (Abbildung 8). Patienten mit Wagner-Stadium 1 ($31,0 \pm 6,8 \text{ kg/m}^2$) hatten einen signifikant höheren BMI als Patienten mit Wagner-Stadium 3 ($28,0 \pm 5,1 \text{ kg/m}^2$; $p=0,044$) oder Wagner-Stadium 4 ($27,6 \pm 4,8 \text{ kg/m}^2$; $p=0,025$).

Abbildung 8: Korrelation Wagner-Stadium und BMI



Jeder Punkt entspricht einem Individuum, die Balken entsprechen den jeweiligen Medianen. Patienten in Wagner-Stadium 0 bzw. 5 wurden aufgrund geringer Fallzahlen nicht dargestellt. Getestet wurde mit Kruskal-Wallis und Dunn's multiplem Vergleichstest.

Auch die kardiovaskuläre Morbidität war mit der Schwere des Wagner-Stadiums assoziiert (Tabelle 7). Patienten mit höhergradigen Ulzera litten häufiger an peripherer arterieller Verschlusskrankheit, koronarer Herzerkrankung oder an einem Schlaganfall.

Tabelle 7: Assoziation Wagner-Stadium mit kardiovaskulärer Morbidität

Klassifikation nach Wagner	n gesamt	paVK		KHK		Apoplex	
		n	%	n	%	n	%
Stadium 1	32	18	56,3	12	37,5	3	9,4
Stadium 2	61	45	73,8	26	42,6	10	16,4
Stadium 3	26	19	73,1	11	42,3	6	23,1
Stadium 4	37	30	81,1	18	48,6	12	32,4

Interessanterweise war die Schwere des diabetischen Fußsyndroms nicht signifikant mit einem steigenden HbA1c-Wert korreliert, es war lediglich eine Tendenz zu höheren Werten vorhanden. Patienten im Wagner-Stadium 1 wiesen einen durchschnittlichen HbA1c-Wert von 7,31 % auf, während bei Patienten im Wagner-Stadium 4 ein durchschnittlicher HbA1c -Wert von 7,92 % vorlag.

In Hinblick auf Alter, Gesamt-Cholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin oder Triglyzeride zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Wagner-Stadien.

3.5. Schwere des diabetischen Fußsyndroms und Immunmediatoren

Es bestand eine signifikante Assoziation zwischen steigendem Wagner-Stadium und den Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen sowie des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (Abbildung 9). Es bestanden jeweils signifikante Unterschiede zwischen Wagner-Stadium 1 und den Stadien 3 bzw. 4. Die übrigen Zytokine zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

Abbildung 9: Assoziation Wagner-Stadium und Immunmediatoren

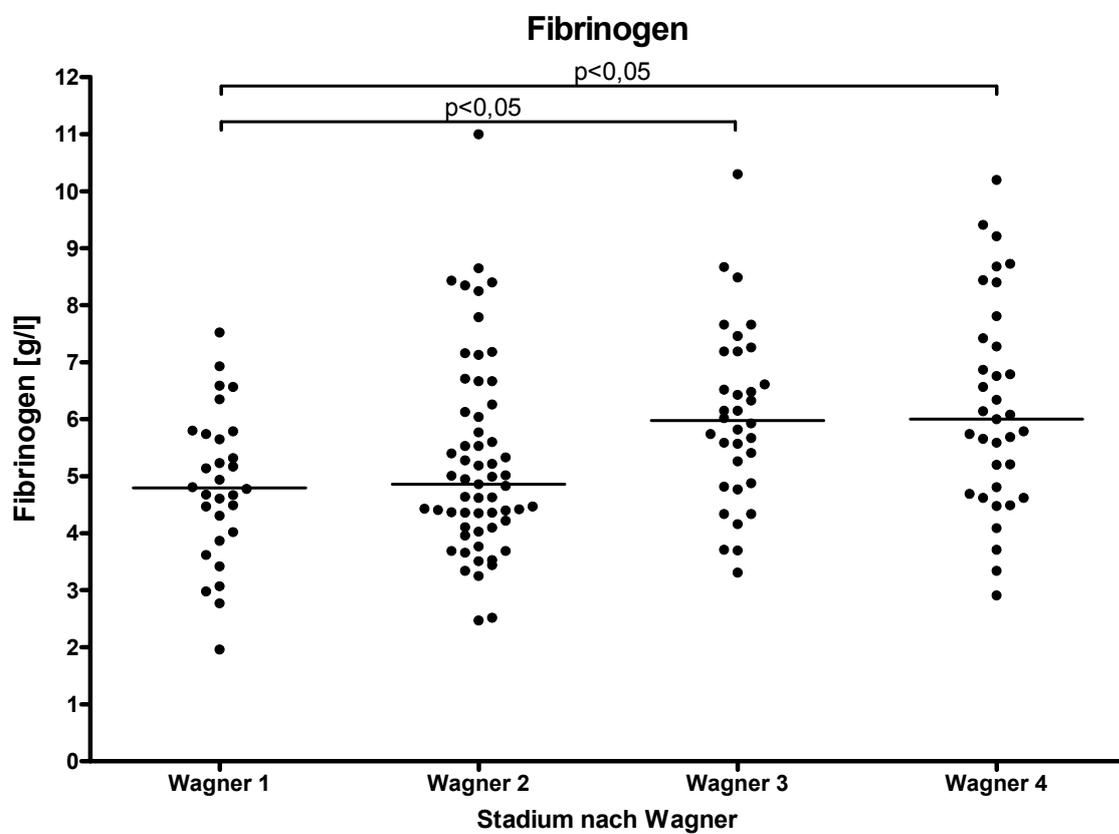
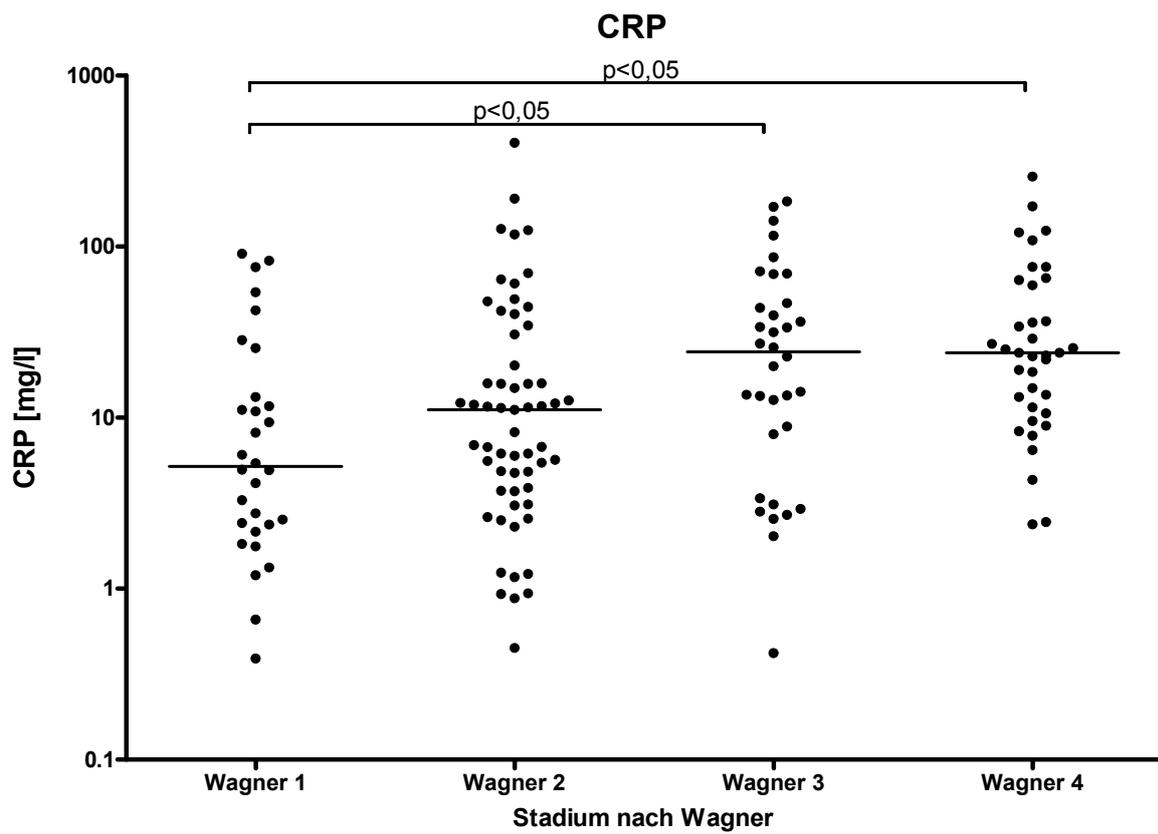
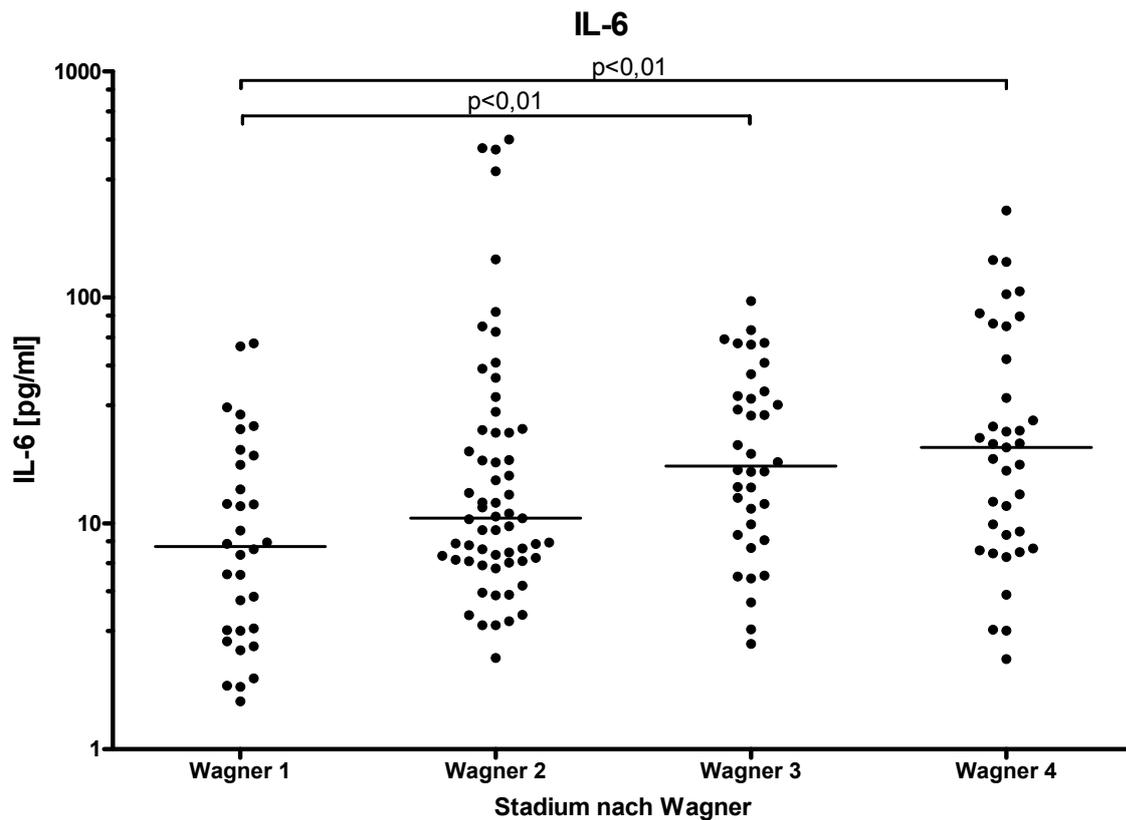


Abbildung 9 (fortgesetzt)



Jeder Punkt entspricht einem Individuum, die Balken entsprechen den jeweiligen Medianen. Patienten in Wagner-Stadium 0 bzw. 5 wurden aufgrund geringer Fallzahlen nicht dargestellt. Getestet wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiplem Vergleichstest.

Um den zusätzlichen Einfluss verschiedener relevanter klinischer Parameter zu untersuchen, wurden auch hier Regressionsmodelle berechnet. Hier zeigte sich, dass der Diabetes-Typ keinen Einfluss auf die bestehenden Korrelationen hat (Tabelle 8). Ebenso scheinen die klassischen Confounder wie Alter und Geschlecht nur einen geringen Einfluss auf die Assoziation zu haben. Gleiches galt für die metabolischen Marker sowie die Diabetes-assoziierten Komplikationen. Durch die Adjustierung auf alle Variablen im vollen Modell einschließlich des Infektionsgrades wurden die Assoziationen von CRP, Fibrinogen und IL-6 mit dem Wagner-Stadium zwar etwas abgeschwächt, blieben aber signifikant. Hier zeigte sich nun auch eine sehr schwache, inverse Assoziation von IP-10 und Wagner-Stadium.

3.6. Infektionsgrad und Immunmediatoren

Umgekehrt besteht ebenfalls eine signifikante Assoziation des Infektionsgrades mit den Konzentrationen von CRP und Interleukin-6 (Abbildung 10). Die übrigen Zytokine zeigten keinen signifikanten Zusammenhang (Tabelle 9). Die beobachtete

signifikante Assoziation von IL-6 lässt sich nach Adjustierung auf das Wagner-Stadium nicht mehr nachweisen. Nach Adjustierung auf die metabolischen Marker (Modell 3a und Modell 4) besteht für CRP und Fibrinogen keine signifikante Assoziation mehr, d.h. die metabolischen Marker sind hier als Confounder zu interpretieren.

Tabelle 8: Regressionsmodelle Assoziation von Wagner-Stadium und Immunmediatoren

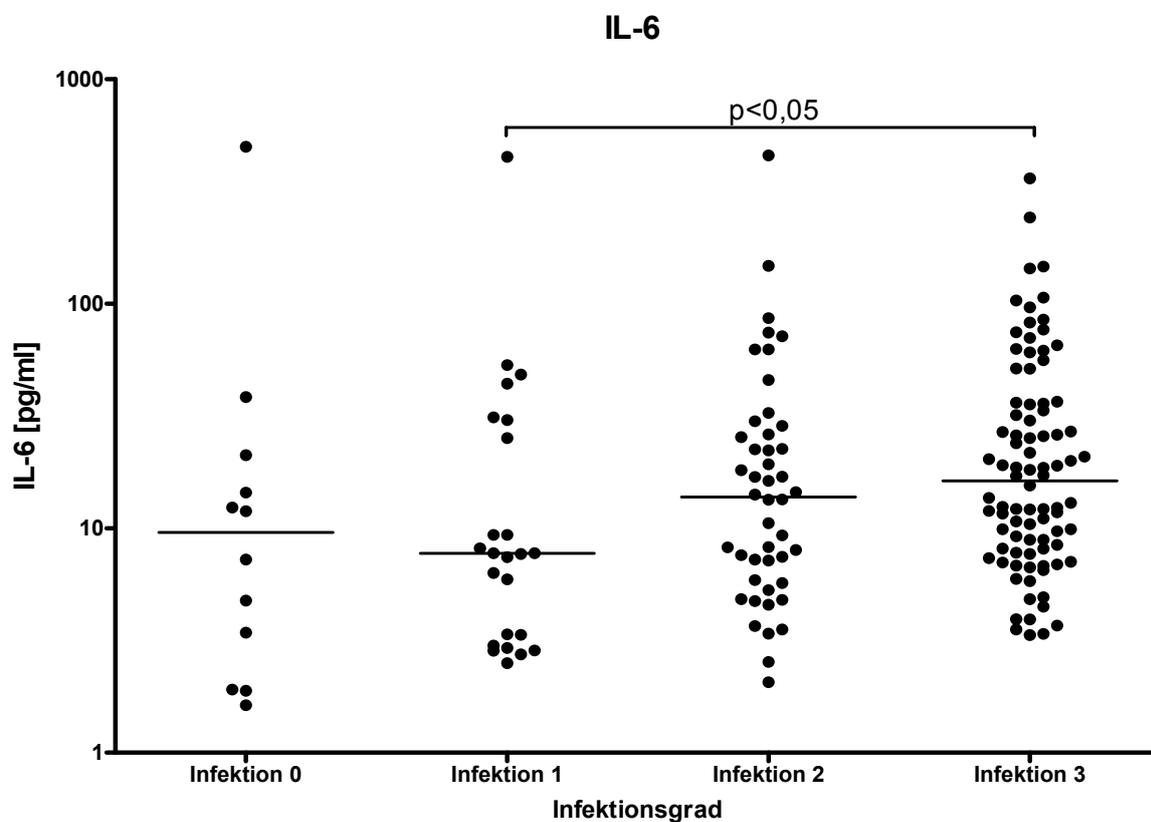
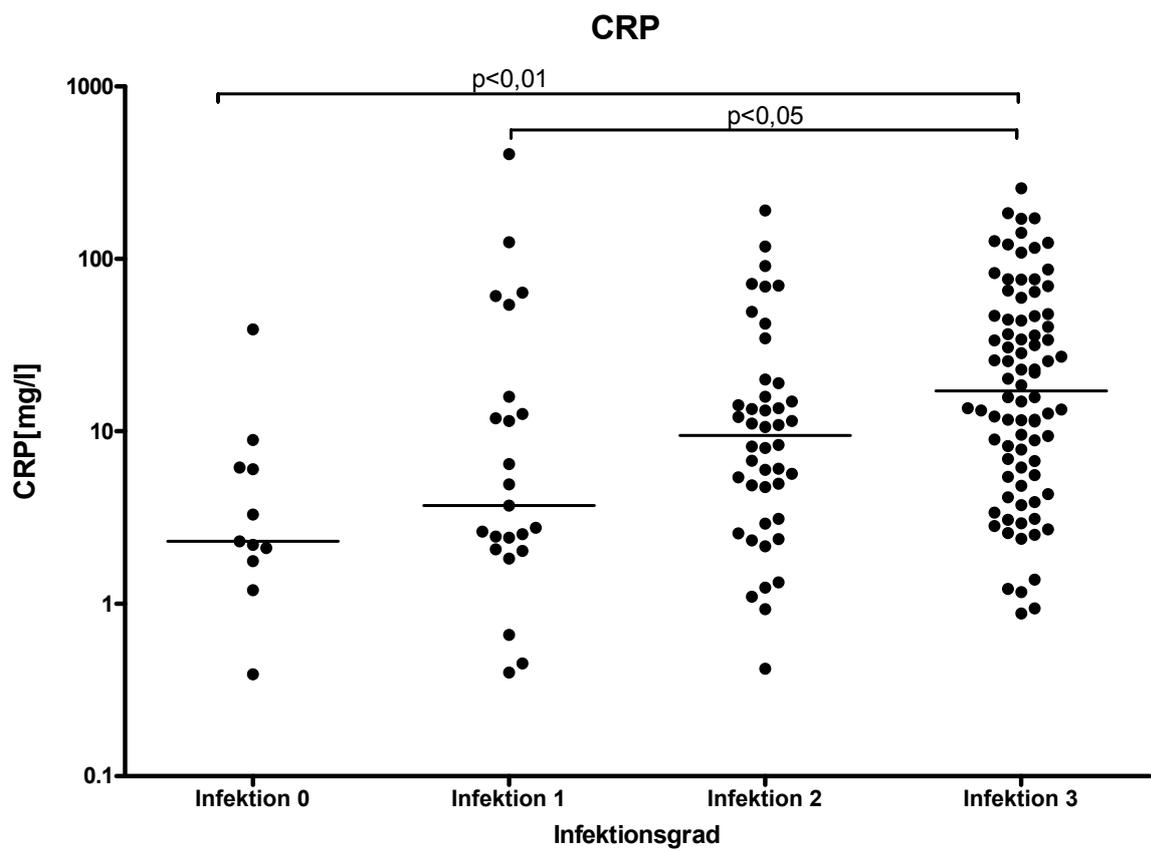
Variable / Modell	Modell 0: nicht adjustiert		Modell 1a: adjustiert auf Alter, Geschlecht		Modell 1b: adjustiert auf Alter, Geschlecht, DM-Typ		Modell 2: Modell 1b + Infektionsgrad		Modell 3a: Modell 2 + metabolische Marker		Modell 3b: Modell 2 + diabetische Komplikationen		Modell 4: volles Modell (mit DM-Typ)	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
CRP	0,388	0,0003	0,398	0,0003	0,393	0,0003	0,303	0,0073	0,285	0,019	0,297	0,011	0,301	0,015
Fibrinogen	0,073	0,0006	0,075	0,0006	0,074	0,0007	0,056	0,013	0,064	0,0082	0,053	0,023	0,062	0,011
IL-6	0,327	<0,0001	0,333	<0,0001	0,335	<0,0001	0,300	0,0005	0,264	0,0025	0,286	0,0012	0,259	0,0036
MIF	0,102	0,091	0,107	0,08	0,106	0,086	0,097	0,14	0,074	0,32	0,093	0,17	0,07	0,35
IL-18	-0,003	0,96	-0,006	0,91	-0,008	0,89	-0,021	0,74	-0,017	0,80	-0,015	0,82	-0,01	0,88
IL-8	0,058	0,38	0,058	0,37	0,061	0,35	0,047	0,50	0,035	0,66	0,044	0,54	0,028	0,73
MIP-1	-0,052	0,34	-0,027	0,61	-0,026	0,63	-0,044	0,44	-0,051	0,43	-0,03	0,61	-0,046	0,49
MCP-1	0,029	0,51	0,028	0,54	0,028	0,53	0,034	0,48	0,036	0,49	0,042	0,40	0,038	0,48
IP-10	-0,051	0,19	-0,057	0,14	-0,056	0,14	-0,05	0,23	-0,082	0,057	-0,055	0,19	-0,091	0,031
RANTES	-0,002	0,97	-0,008	0,85	-0,008	0,86	0,003	0,95	0,011	0,83	0,004	0,94	0,015	0,76

Tabelle 9: Regressionsmodelle Assoziation von Infektionsgrad und Immunmediatoren

Variable / Modell	Modell 0: nicht adjustiert		Modell 1a: adjustiert auf Alter, Geschlecht		Modell 1b: adjustiert auf Alter, Geschlecht, DM-Typ		Modell 2: Modell 1b + Infektionsgrad		Modell 3a: Modell 2 + metabolische Marker		Modell 3b: Modell 2 + diabetische Komplikationen		Modell 4: volles Modell (mit DM-Typ)	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
CRP	0,44	<0,0001	0,44	0,0005	0,43	0,0007	0,32	0,015	0,22	0,15	0,33	0,014	0,23	0,14
Fibrinogen	0,083	0,0009	0,086	0,0006	0,084	0,0009	0,063	0,0162	0,024	0,42	0,063	0,017	0,025	0,41
IL-6	0,25	0,0074	0,24	0,013	0,24	0,014	0,12	0,22	0,12	0,28	0,11	0,26	0,11	0,29
MIF	0,06	0,40	0,066	0,35	0,067	0,35	0,03	0,69	0,03	0,75	0,033	0,67	0,041	0,66
IL-18	0,034	0,60	0,032	0,63	0,032	0,62	0,041	0,56	0,10	0,24	0,057	0,43	0,11	0,20
IL-8	0,083	0,27	0,065	0,39	0,064	0,40	0,044	0,59	0,022	0,82	0,026	0,76	0,012	0,91
MIP-1	0,021	0,74	0,044	0,47	0,043	0,48	0,061	0,35	0,09	0,27	0,09	0,18	0,113	0,17
MCP-1	0,0001	0,99	-0,005	0,92	-0,005	0,92	-0,019	0,73	0,02	0,76	-0,009	0,87	0,016	0,81
IP-10	-0,023	0,61	-0,041	0,35	-0,042	0,34	-0,022	0,64	-0,036	0,49	-0,036	0,45	-0,044	0,40
RANTES	-0,034	0,49	-0,035	0,49	-0,035	0,49	-0,036	0,50	-0,032	0,61	-0,021	0,70	-0,033	0,61

Angegeben sind die Regressionskoeffizienten β sowie die zugehörigen p-Werte. Alle Immunmediatoren sind als logarithmierte Werte (ln) in die Modelle eingegangen. DM-Typ: Diabetes mellitus Typ; metabolische Marker: HbA1c, BMI, Hyperlipidämie, Hypertonie; diabetische Komplikationen: paVK, diabetische Polyneuropathie, KHK

Abbildung 10: Assoziation Infektionsgrad und Immunmediatoren



Jeder Punkt entspricht einem Individuum, die Balken entsprechen den jeweiligen Medianen. Getestet wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiplem Vergleichstest.

3.7. Vergleich der Immunmediatoren der Patienten im Verlauf

Tabelle 10 zeigt den Verlauf der Konzentrationen der gemessenen Immunmediatoren.

Tabelle 10: Übersicht der Immunmediatoren-Spiegel der Patienten im Verlauf

	BD1	BD2	p-Wert	BD3	p-Wert
CRP [mg/l]^b	12,4 [5,8; 56,8]	10,9 [4,3; 24,3]	<0,05	7,3 [2,6; 17,5]	<0,001
Fibrinogen [g/l]^a	5,8 ± 1,7	5,5 ± 1,4	ns	5,4 ± 1,5	ns
IL-6 [pg/ml]^b	13,4 [6,9; 32,3]	11,2 [5,2; 19,4]	ns	10,7 [4,4; 16,1]	<0,01
MIF [ng/ml]^b	7,8 [5,5; 12,3]	6,9 [3,9; 11,1]	ns	7,2 [4,0; 10,0]	<0,05
IL-18 [pg/ml]^b	125,7 [93,8; 189,9]	123,4 [85,6; 178,0]	<0,001	118,2 [91,0; 176,1]	<0,05
IL-8 [pg/ml]^b	12,6 [7,4; 20,2]	13,9 [8,7; 19,7]	ns	13,4 [9,0; 18,2]	ns
MIP-1α [pg/ml]^b	90,2 [54,9; 142,4]	90,4 [57,7; 152,4]	ns	84,6 [56,4; 155,1]	ns
MCP-1 [pg/ml]^b	267,1 [168,2; 387,7]	252,9 [175,0; 372,7]	ns	265,7 [181,5; 372,0]	ns
IP-10 [pg/ml]^b	427,6 [329,1; 548,6]	428,6 [328,0; 570,2]	ns	430,8 [343,9; 548,2]	ns
RANTES [ng/ml]^a	80,8 ± 43,2	87,7 ± 46,4	ns	86,9 ± 46,9	ns

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (gekennzeichnet durch ^a) bzw. Mediane und 25./75. Perzentilen (gekennzeichnet durch ^b). Die statistische Signifikanz wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests und Dunn's multiplem Vergleichstest in Bezug auf die Werte bei Aufnahme bestimmt.

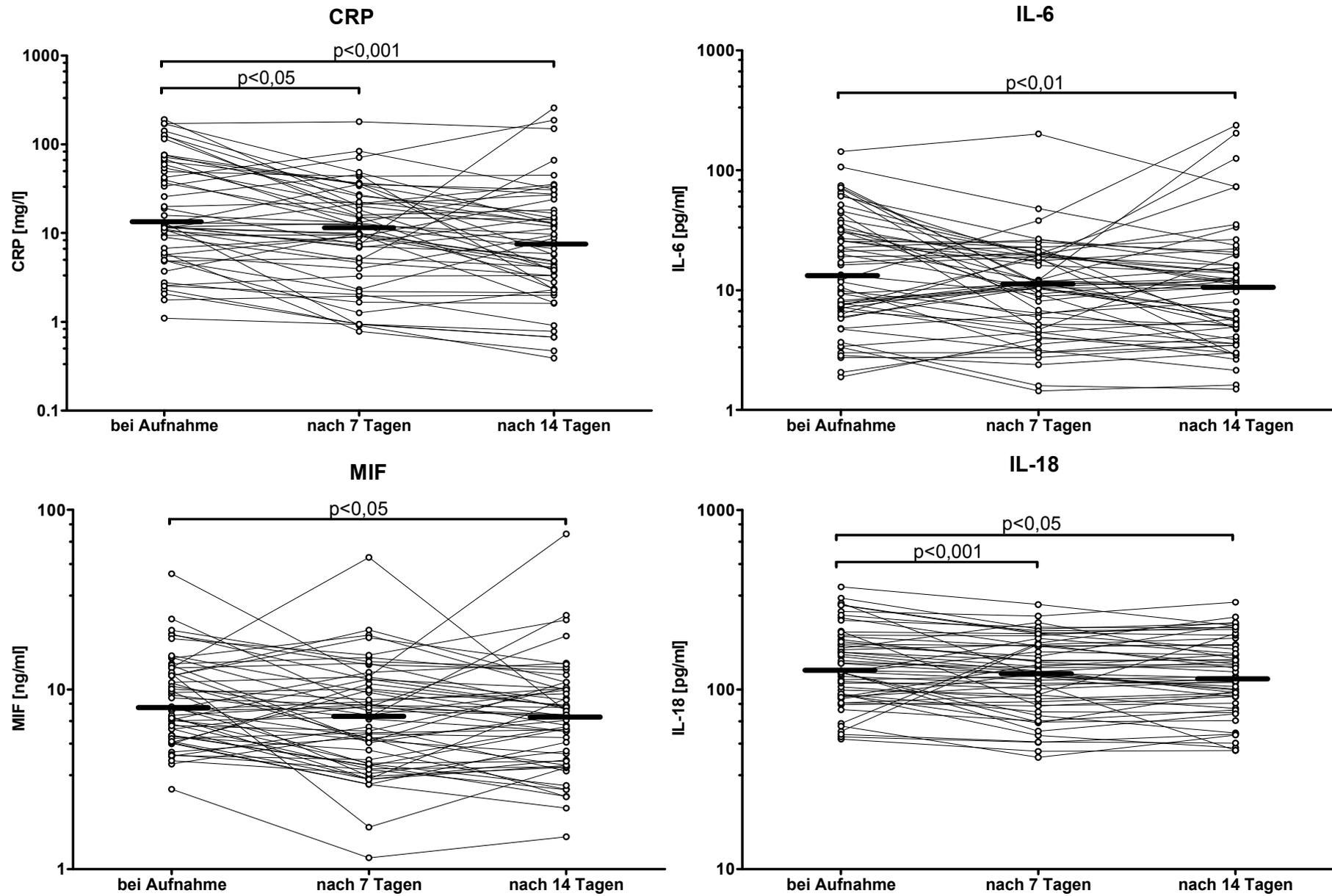
Im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes kam es in der Patientengruppe zum signifikanten Abfall des CRP (Abbildung 11), wohingegen sich die Fibrinogen-Spiegel als weiteres Akut-Phase-Protein nicht signifikant veränderten, aber ebenfalls ein Abwärtstrend erkennbar war.

Die Serumspiegel von Interleukin-6 fielen im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes ebenfalls ab, jedoch war nur der Unterschied zwischen 1. und 3. Blutentnahme signifikant, während zwischen 1. und 2. Blutentnahme kein signifikanter Unterschied erreicht wurde. Trotz des beobachteten Abfalls kam es bei einigen Patienten zu einem Anstieg der IL-6-Spiegel.

Ein ähnliches Muster fand sich auch für MIF und IL-18, wobei der Abfall insgesamt schwächer ausfiel.

Bei den übrigen Immunmediatoren RANTES, IL-8, MIP-1α, MCP-1 und IP-10 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes.

Abbildung 11: Immunmediatoren im Verlauf des stationären Aufenthaltes



Angegeben sind die entsprechenden Mediane, ein Punkt entspricht einem Individuum. Getestet wurde mit Dunn's multiplern Vergleichstest.

3.8. Vergleich der Immunmediatoren-Spiegel von Patienten (14 Tage nach Aufnahme) und Kontrollen

Vergleicht man diejenigen Immunmediatoren, die im Vergleich zur Kontrollgruppe initial erhöhte Konzentrationen aufwiesen und im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes einen signifikanten Abfall in ihrer Konzentration zeigten, so kann festgestellt werden, dass auch nach 14 Tagen immer noch signifikant und deutlich erhöhte Konzentrationen gegenüber den Kontrollen vorlagen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich Immunmediatoren-Spiegel der Patienten (14 Tage nach Aufnahme) vs. Kontrollen

	Patienten	Kontrollen	p-Wert
CRP [mg/l] ^b	7,3 [2,6; 17,5]	2,4 [1,0;5,0]	<0,0001 [#]
Fibrinogen [g/l] ^a	5,4 ± 1,5	3,8 ± 0,9	<0,0001*
IL-6 [pg/ml] ^b	10,7 [4,4; 16,1]	3,8 [2,6;5,2]	<0,0001 [#]
MIF [ng/ml] ^b	7,15 [4,0; 10,0]	4,3 [3,1;6,6]	<0,0001 [#]
IL-18 [pg/ml] ^b	118,2 [91,0; 176,1]	122,7 [85,0;172,0]	ns [#]
IL-8 [pg/ml] ^b	13,4 [9,0; 18,2]	10,0 [6,8;15,9]	ns [#]
MIP-1α [pg/ml] ^b	84,6 [56,4; 155,1]	61,2 [44,1;107,4]	0,015 [#]
MCP-1 [pg/ml] ^b	265,7 [181,5; 372,0]	303,3 [213,8;415,6]	ns [#]
IP-10 [pg/ml] ^b	430,8 [343,9; 548,2]	299,4 [216,9;401,6]	<0,0001 [#]
RANTES [ng/ml] ^a	86,9 ± 46,9	100,3 ± 44,7	0,008*

Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung (symbolisiert durch ^a), Median und 25./75. Perzentilen (symbolisiert durch ^b). Die Gruppenvergleiche erfolgten mit dem t-Test* bzw. Mann-Whitney-Test[#].

Auch nach Adjustierung auf die möglichen Confounder analog zum Vergleich der ersten Blutentnahme der Patienten und Kontrollen zeigten sich die in Tabelle 11 beobachteten Unterschiede stabil (Tabelle 12). Sowohl Regressionskoeffizienten als auch p-Werte blieben über die verschiedenen Analysen nahezu unverändert bestehen und waren im Vergleich zur Assoziation zwischen erster Blutentnahme der Patienten und Kontrollen im voll adjustierten Modell lediglich für CRP ($\beta=1,74$ vs. $\beta=0,93$) und IL-6 ($\beta=1,47$ vs. $\beta=0,93$) abgeschwächt.

Tabelle 12: Regressionsmodelle des Vergleichs Patienten (3. Blutentnahme) vs. Kontrollen

Variable / Modell	Modell 0: DM-Typ		Modell 1: Modell 0 + Alter, Geschlecht		Modell 2a: Modell 1 + BMI, HbA1c, Hypertonus, Hyperlipidämie		Modell 2b: Modell 1 + paVK, Neuropathie, KHK		Modell 3: volles Modell	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
CRP	1,01	<0,0001	0,95	<0,0001	1,00	<0,0001	0,94	<0,0001	0,93	<0,0001
Fibrinogen	0,32	<0,0001	0,30	<0,0001	0,32	<0,0001	0,28	<0,0001	0,30	<0,0001
IL-6	1,17	<0,0001	1,11	<0,0001	1,06	<0,0001	0,98	<0,0001	0,93	<0,0001
MIF	0,50	<0,0001	0,51	<0,0001	0,50	<0,0001	0,52	<0,0001	0,50	0,0002
IL-18	-0,05	0,63	-0,05	0,67	-0,03	0,77	0,05	0,68	0,05	0,73
IL-8	0,14	0,21	0,08	0,46	0,09	0,46	0,12	0,38	0,10	0,50
MIP-1 α	0,17	0,10	0,19	0,07	0,20	0,08	0,31	0,01	0,29	0,03
MCP-1	-0,01	0,93	-0,03	0,78	-0,02	0,83	0,03	0,79	0,003	0,98
IP-10	0,64	<0,0001	0,59	<0,0001	0,59	<0,0001	0,61	0,0001	0,57	0,0006
RANTES	-0,26	0,0007	-0,26	0,0009	-0,21	0,011	-0,18	0,040	-0,16	0,083

Angegeben sind logarithmierte Regressionskoeffizienten β sowie die zugehörigen p-Werte.

3.9. Assoziation klinischer Variablen auf den Verlauf der Immunmediatoren

Um mögliche Einflussfaktoren auf den Verlauf der Immunmediatoren in den ersten 14 Tagen nach stationärer Aufnahme zu analysieren, wurde zunächst die Ratio aus den Immunmediatorspiegeln zu Beginn und nach 14 Tagen gebildet. Ein Wert > 1 bedeutete dabei einen Abfall, ein Quotient < 1 einen Anstieg der Spiegel. Nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht, Infektion, Wagner-Stadium und Diabetes-Typ zeigten sich die in Tabelle 13 aufgeführten Assoziationen.

Es zeigten sich als signifikante Einflussfaktoren das Alter und Geschlecht in Bezug auf den Verlauf von IL-6 nach Adjustierung für Wagner-Stadium, Infektionsgrad und Diabetestyp. Je älter die Patienten waren, desto stärker fiel der Abfall von IL-6 aus. Frauen zeigten einen stärkeren Abfall der IL-6-Spiegel. Ebenso hatte das Wagnerstadium nach Adjustierung einen starken Einfluss auf den Verlauf des CRP. Bei höheren Wagner-Stadien fand sich ein deutlicherer Abfall der CRP-Serumspiegel. Zusätzlich bestand eine schwache Assoziation des Diabetes-Typs auf den Verlauf von IP-10 nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht, Infektionsgrad und Wagner-Stadium. Das Vorliegen eines Typ 2 Diabetes war mit einem Anstieg der IP-10-Spiegel verbunden.

Tabelle 13: Assoziation klinischer Variablen und Immunmediatoren-Verlauf

	CRP-Ratio		Fibr-Ratio		IL-6-Ratio		MIF-Ratio		IL-18-Ratio	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
Alter	-0,042	0,11	-0,003	0,07	-0,014	0,025	0,006	0,18	0,001	0,65
Geschlecht	0,863	0,09	0,013	0,70	0,266	0,037	-0,040	0,68	-0,029	0,26
Infektion	0,097	0,72	-0,005	0,76	0,053	0,43	0,067	0,20	0,006	0,68
Wagner	0,638	0,005	-0,016	0,28	-0,025	0,66	0,003	0,95	0,004	0,75
DM-Typ	0,307	0,84	0,062	0,52	0,133	0,60	0,011	0,96	-0,023	0,65

	IL-8-Ratio		MIP-1 α -Ratio		MCP-1-Ratio		IP-10-Ratio		RANTES-Ratio	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
Alter	0,002	0,65	-0,0004	0,71	0,0002	0,85	0,001	0,16	-0,002	0,45
Geschlecht	-0,032	0,74	0,003	0,88	-0,002	0,91	-0,021	0,25	0,034	0,46
Infektion	-0,051	0,33	-0,001	0,96	0,006	0,57	-0,002	0,86	-0,005	0,85
Wagner	0,009	0,84	-0,003	0,80	0,007	0,39	-0,013	0,12	0,007	0,75
DM-Typ	0,090	0,64	0,005	0,92	0,026	0,49	-0,087	0,020	0,046	0,63

Angegeben sind logarithmierte Regressionskoeffizienten β adjustiert auf die weiteren in der Tabelle angegebenen Einflussfaktoren sowie die zugehörigen p-Werte. Ratio: Quotient aus dem Wert der ersten Blutentnahme und dem Wert der dritten Blutentnahme. DM-Typ: Diabetes mellitus Typ, Fibr: Fibrinogen

4. Diskussion

4.1. Einleitung

Es ist heute unumstritten und gut dokumentiert, dass bei der Pathogenese des Typ 2 Diabetes auch immunologische Prozesse eine Rolle spielen⁸⁸. Das diabetische Fußsyndrom hingegen bleibt bei sicherer Identifikation der klinischen Risikofaktoren in seinen molekularen und zellulären Mechanismen jedoch noch weitgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit sollte sein zu untersuchen

1. inwieweit das Vorliegen eines diabetischen Fußsyndroms mit einer erhöhten systemischen Inflammation einhergeht,
2. welche klinischen Variablen Einfluss auf die Schwere des Fußsyndroms oder die Immunmarker haben,
3. ob die klinischen Parameter wie Wagner-Stadium oder Infektionsgrad sich im Immunmarker-Profil widerspiegeln sowie
4. ob und wie sich diese Inflammation im Verlauf der Heilung ändert.

In der Literatur sind Arbeiten zu dieser Fragestellung kaum zu finden. Nach dem internationalem Konsensus über Definition, Diagnostik und Therapie des diabetischen Fußsyndroms¹⁶⁰ von 1999 stieg die Anzahl der Publikationen zwar an, jedoch wurde nahezu ausschließlich epidemiologische, sozioökonomische und klinisch-therapeutische Forschung betrieben.

Es gibt einige wenige Arbeiten, die den Verlauf verschiedener Zytokin- und Chemokinspiegel im Wundserum im Tierversuch⁸⁵ oder bei nicht-diabetischen Menschen (z.B. im Rahmen chronisch-venöser Ulzera)¹⁶¹ untersucht haben. Allerdings fällt die Bestimmung von Zytokinen aus Wundsekreten methodisch schwer: es existieren keine standardisierten Entnahmetechniken, es kommt häufig zur Eintrocknung. Eine umfassende Bestimmung des Grades und der Art der systemischen Inflammation anhand eines breiten serologischen Immunmarkerprofils bei Patienten mit diabetischem Fußsyndrom wie in dieser Arbeit ist bisher nicht publiziert worden.

4.2. Studienkollektiv und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer

Diabetespatienten mit und ohne diabetischem Fußsyndrom unterschieden sich in einigen Parametern, die für die Analyse der Daten relevant sein können und daher hier kurz diskutiert werden sollen.

Die unterschiedliche Altersverteilung - Fußpatienten sind signifikant älter - kann folgendermaßen erklärt werden. Unter den Kontrollen befanden sich einerseits mehr Typ 1 Diabetiker, welche klassischerweise deutlich jünger als Typ 2 Diabetiker sind. Nimmt man die Typ 1 Diabetiker aus der Altersberechnung heraus, bleibt jedoch immer noch ein signifikanter Altersunterschied bestehen. Zusätzlich ist das Risiko, ein diabetisches Fußsyndrom zu entwickeln, indirekt altersabhängig, d.h. abhängig von der Diabetes-Erkrankungsdauer⁶, was einen weiteren Grund für die Altersdifferenz darstellen könnte.

Die Patienten zeigten bei Aufnahme signifikant niedrigere HbA1c-, Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte, die HDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Werte unterschieden sich nicht. Ebenfalls war der arterielle Blutdruck unter den Patienten signifikant niedriger, sowohl systolischer wie auch diastolischer Wert. Im Hinblick auf den BMI zeigte sich nach Ausschluss der Typ 1 Diabetiker ein schwach signifikanter Unterschied, die Fußpatienten waren im Mittel um 1,5 kg/m² leichter. Diese Ergebnisse stehen der Beobachtung entgegen, dass Fußpatienten an sich im Vergleich zu gesunden diabetischen Personen eine insgesamt höhere Prävalenz an kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie oder Hypertriglyzeridämie aufweisen¹⁶².

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass sich das Patientenkollektiv in engerer fach- und hausärztlicher Betreuung als die Diabetiker ohne diabetisches Fußsyndrom befand und somit die beeinflussbaren Risikofaktoren von den jeweiligen Kollegen strikter eingestellt wurden. Zudem rekrutierten sich die diabetischen Kontrollen aus Diabetikern, deren Blutzuckerspiegel von ihren betreuenden Hausärzten nicht ausreichend eingestellt werden konnten und welche aus diesem Grund nachfolgend an die Ambulanz der Deutschen Diabetes Klinik verwiesen wurden. Hier ist also von einer länger andauernden unzureichenden Einstellung sowohl des Blutzuckers als auch der Hyperlipidämie auszugehen.

Beim Vergleich der Diabetes-assoziierten Erkrankungen fiel auf, dass das Patientenkollektiv insgesamt deutlich häufiger betroffen war (Tabelle 2). Hier zeigte sich ein Trend, auf den auch andere Arbeitsgruppen bereits hinweisen konnten. Die kardiovaskuläre Morbidität von Fußpatienten ist ungleich höher als die von Diabetikern ohne diabetisches Fußsyndrom¹⁶²⁻¹⁶⁴. Gleichfalls waren - analog dem Wagner-Stadium - höhergradige Ulzera mit einer höheren kardiovaskulären Morbidität assoziiert (Ergebnisse, Tabelle 7). Dies konnte erst kürzlich gezeigt werden¹⁶⁵. Ferner lässt sich die größere Prävalenz von diabetischer Neuropathie und paVK innerhalb des Patientenkollektivs auch damit erklären, dass diabetische Neuropathie und paVK die ätiologisch wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines diabetischen Ulkus darstellen¹⁶⁶.

Was die Lokalisation der diabetischen Ulzera betrifft, stimmte das Verteilungsmuster der beobachteten Ulzera in der untersuchten Patientengruppe mit der allgemein beschriebenen Verteilungshäufigkeit überein und entsprach damit der üblichen Lehrmeinung²⁴.

4.3. Erhöhte systemische Inflammation in der Patientengruppe

Patienten mit diabetischem Fußsyndrom zeigten im Vergleich zu den diabetischen Kontrollen signifikant erhöhte Spiegel von CRP, Fibrinogen, IL-6, MIF und IP-10 sowie MIP-1 α , die zwischen 30 und 400 % höher lagen. Selbst nach 14 Tagen Aufenthalt im Krankenhaus blieben die beobachteten Unterschiede bestehen. Die Regressionsmodelle zeigten, dass weder Alter und Geschlecht, Hyperlipidämie oder Hypertonus, noch die Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen die beobachtete, erhöhte systemische Inflammation bedingen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war vor allem die durch die Wagner-Klassifikation definierte Schwere des diabetischen Ulkus mit einer erhöhten Inflammation assoziiert.

Die Patienten zeigten im Vergleich zu den diabetischen Kontrollen erhöhte CRP- und Fibrinogen-Spiegel, welche grundsätzlich entweder als Zeichen einer Akut-Phase-Reaktion im Rahmen einer Infektion oder als Folge der Wunde an sich interpretiert werden können. Die Bildung von CRP und Fibrinogen wird vor allem durch IL-6 induziert^{167,168}. 1992 konnte bereits gezeigt werden, dass CRP umgekehrt auch die Bildung von IL-6 stimuliert¹⁶⁹. Kürzlich wurde in vitro nachgewiesen, dass CRP

dosisabhängig neben der Induktion von IL-6 ebenso die Bildung von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β und IL-8 induziert als auch die Expression von MIP-1 α hemmt¹⁷⁰. Analog zu diesen physiologischen Grundlagen zeigte sich eine starke Korrelation von CRP und IL-6 in der Patientengruppe ($r=0,78$) wie auch in der Kontrollgruppe ($r=0,591$). Ebenso korrelierte Fibrinogen hochsignifikant mit IL-6 in der Patienten- ($r=0,59$) als auch in der Kontrollgruppe ($r=0,43$). Bei dem in dieser Arbeit neben CRP gleichzeitig gemessenen Zytokin IL-8 findet sich in der Patientengruppe nur eine mäßig ausgeprägte und schwach signifikante Korrelation ($r=0,191$), in der Gruppe der Kontrollen zeigte sich dagegen keine signifikante Korrelation.

Die zitierten in vitro Daten könnten die beobachteten Korrelationen erklären und in eine kausale Beziehung zueinander setzen.

Das bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte IL-6 scheint im Prozess der Wundheilung neben der beschriebenen immunogenen Wirkung vor allem Einfluss auf die Fibroblasten zu nehmen. IL-6 führt zur Erhöhung ihrer mitotischer Aktivität und somit zur vermehrten Kollagenproduktion¹⁷¹. Im Tierversuch zeigen IL-6-defiziente Mäuse eine verzögerte Wundheilung¹⁷². Es konnte eine verminderte Expression der Matrix-Metalloproteinasen sowie der TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases), welche die proteolytische Aktivität dieser Proteinase kontrollieren, festgestellt werden¹⁷³. Im Wundsekret chronisch-venöser Ulzera waren erniedrigte IL-6-Spiegel mit einer verzögerten Wundheilung assoziiert¹⁷⁴. Ebenso zeigten sich im Wundserum diabetischer Ratten erniedrigte IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen¹⁷⁵.

Ob und wie sich serologisch erhöhte IL-6-Spiegel auf die Regulation dieser Proteinase und deren Kontrollenzymen auswirkt, ist unbekannt. Denkbar ist, dass unphysiologisch hohe Spiegel ebenso wie das vollständige Fehlen von IL-6 zu einer Dysregulation der durch die von den verschiedenen MMP vermittelten Proteolyse und damit zu einer verlängerten Wundheilungszeit führen. Dass die beobachteten Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien stammen, macht einen Vergleich unmöglich. Hilfreicher wäre hier eine Studie, in der IL-6 im Wundsekret als auch im Serum derselben diabetischen Versuchstiere oder Probanden bestimmt worden wäre.

Die systemische, signifikante Erhöhung der MIF-Serumspiegel im Patientenkollektiv kann mit seiner Rolle als zentrales Zytokin der angeborenen Immunabwehr erklärt werden¹⁷⁶. Gleichzeitig zeigen sich sowohl in Patienten- als auch in der Kontrollgruppe erhöhte MIF-Serumspiegel im Vergleich zu gesunden, nicht-diabetischen Kontrollen (zwecks orientierendem Vergleich der Normwerte siehe diese Publikation¹⁷⁷ aus unserer Arbeitsgruppe), was auf die vorliegende Grunderkrankung Diabetes zurückgeführt werden kann.

Im Hinblick auf den spezifischen Prozess der Wundheilung wird MIF als ein zentraler Mediator genannt, der auf molekularer Ebene die Regulation von Genen im Bereich der Inflammation und Reparation beeinflusst⁸⁰. Darunter fallen Gene, welche für Zytokine wie MIF selbst oder IL-6 kodieren als auch für Proteine wie TIMP1, MMP-3 oder Matrixproteine wie Prokollagen oder Kollagen. Neueste Arbeiten deuten darauf hin, dass MIF einen Angriffspunkt für die Wirkung der Steroide auf die Wundheilung bietet. Erhöhte MIF-Spiegel führen im Tierversuch beim Fehlen von Sexualhormonen zu einer gestörten Wundheilung¹⁷⁸, was einen Mechanismus in der Erklärung von Geschlechtsunterschieden bei der Wundheilung darstellen könnte¹⁷⁹. Das Patientenkollektiv wies signifikant erhöhte Serumspiegel an MIF auf. Dass erhöhte MIF-Spiegel allein zu einer gestörten Wundheilung führen, ist bisher nicht berichtet worden. Die bestehende schwache, aber signifikante Korrelation zwischen MIF und den Akut-Phase-Proteinen CRP und Fibrinogen und IL-6 lässt als mögliche Schlussfolgerung zu, dass die beobachtete Erhöhung der MIF-Spiegel ebenso von IL-6 induziert werden könnte.

Erhöhte Serumspiegel von IP-10 finden sich in prädiabetischen Patienten sowie in Typ 2 Diabetikern^{110;149}, was sich in beiden untersuchten Kollektiven nachweisen ließ: sowohl die Patienten als auch die Kontrollen zeigten gegenüber stoffwechselgesunden Normalpersonen erhöhte IP-10-Serumspiegel (zwecks orientierendem Vergleich der Normwerte wird auf diese Arbeit¹¹⁰ unserer Arbeitsgruppe verwiesen). In Hinblick auf die Wundheilung steht IP-10 im Verdacht, die Mobilität von Endothelzellen zu behindern, was in einem späteren Stadium des Wundheilungsprozesses zur gestörten Neovaskularisation und damit zur Verlangsamung der Wundheilung führt^{146;180}. Transgene Mäuse, die IP-10 kontinuierlich und in hohem Maße exprimieren, zeigen eine ebenso verzögerte

Wundheilung¹⁸¹. Dies legt nahe, dass erhöhte IP-10-Spiegel Ursache der Wundheilungsstörung und nicht Folge der Wunde sein können.

Die Serumspiegel von MIP-1 α zeigte sich in der Patientengruppe signifikant erhöht. MIP-1 α wirkt als potenter chemotaktischer Reiz sowohl für neutrophile Granulozyten als auch für Monozyten. Es ist bekannt, dass es im Verlauf der Wundheilung zur vermehrten Expression dieses Chemokins kommt^{78;182}, jedoch zeigte sich im Tierversuch überraschenderweise bei MIP-1 α -defizienten Mäusen im Vergleich zu gesunden Tieren eine ungestörte Wundheilung⁷⁷. Leider gibt es keine experimentelle Arbeit, die untersucht, welche Wirkung Überexpression oder exogene Zufuhr von MIP-1 α in Bezug auf die Wundheilung haben.

Die RANTES-Serumspiegel der Patienten mit diabetischem Fußsyndrom waren signifikant niedriger als die der diabetischen Kontrollen. Mehrere Arbeiten zeigten die Assoziation erhöhter RANTES-Spiegel mit dem Vorliegen eines Typ 2 Diabetes^{117;118}, über das Vorliegen erniedrigter RANTES-Spiegel bei Patienten mit diabetischen Ulzera ist bisher nichts bekannt. Auch in der Wundheilungsstörung wurde RANTES bis jetzt nicht als entscheidender Mediator genannt. Weitere Studien müssen zeigen, ob der hier zwischen den beiden Gruppen festgestellte Unterschied einen Zufallsbefund darstellt oder eine pathophysiologisch erklärbare Basis hat.

Sowohl die Serumspiegel von IL-8 als auch die von MCP-1 zeigten im Patienten-Kontrollen-Vergleich keinem signifikanten Unterschied. IL-8 sorgt im orchestrierten Ablauf der Wundheilung für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, während MCP-1 vor allem monozytäre Immunzellen aktiviert¹⁸³, was eine große Bedeutung für die Wundheilung zu haben scheint, denn MCP-1-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verzögerte Wundheilung⁷⁷.

Erhöhte Serumspiegel dieser beiden Chemokine wurden als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes identifiziert¹¹⁰, und die gemessenen Serumspiegel sowohl der Patienten als auch der Kontrollen schienen im Vergleich zu gesunden Normalpersonen erhöht. IL-8 scheint vor allem im viszeralen Fett gebildet zu werden, und die IL-8-Serumkonzentrationen sind mit dem BMI assoziiert¹⁸⁴. Patienten und Kontrollen boten einen ähnlich hohen BMI, was diese These weiter unterstützt.

Im Tiermodell kam es bei transgenen Mäusen, die IL-8 dauerhaft überexprimierten, zu einer verminderten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen entzündlicher Reaktionen. Dauerhaft erhöhte IL-8-Konzentrationen führen zu einer Herunterregulation der Chemokinrezeptoren und somit zur Desensibilisierung der Zielzellen¹⁸⁵. Es ist bekannt, dass prädiabetische Patienten und manifeste Typ 2 Diabetiker erhöhte IL-8-Spiegel aufweisen¹¹⁸. Es ist möglich, dass über diesen Mechanismus die Wundheilungsstörung bei Diabetikern zum Teil erklärt werden kann.

Nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht, metabolische Faktoren (wie HbA1c, BMI und Hyperlipidämie) und diabetische Folgeerkrankungen fiel auf, dass die Berücksichtigung des Diabetes-Typs kaum Einfluss auf die Signifikanz und den Grad der Assoziation hat (Ergebnisse, Tabelle 5). Allerdings war die Anzahl der Typ 1 Diabetiker sehr gering und in Patienten- und Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich verteilt. Daher gelten die hier gezeigten Befunde im wesentlichen für Patienten mit Typ 2 Diabetes.

Zu beachten ist auch, dass es im Alter zu einer ätiologisch noch ungeklärten Aktivierung des innate Immunsystems mit nachfolgender subklinischer Inflammation („inflamm-aging“)¹⁸⁶ kommt, die zur Hochregulation verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren wie IL-1 β , IL-6, TNF- α oder NF κ B führt¹⁸⁷. Die dokumentierten Unterschiede zwischen Diabetikern mit und ohne diabetischem Fußsyndrom blieben jedoch nach Adjustierung auf das Alter nahezu unverändert bestehen, so dass dieser Prozess keinen wesentlichen Einfluss auf die Befunde der vorliegenden Arbeit hat.

Zusammenfassend liegt in der Patientengruppe eine deutlich erhöhte systemische Inflammation vor, die sich in erhöhten Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen sowie der Zytokine IL-6 und MIF und der Chemokine MIP-1 α und IP-10 ausdrückt. Unter Berücksichtigung der durchgeführten Adjustierungen wird deutlich, dass dies nicht Folge einer Infektion der Wunde ist, sondern durch die Wunde selbst bedingt wird.

Leider wurden von den Patienten neben den Blutseren gleichzeitig keine Wundseren gewonnen. Die Messung der Zytokine im Wundsekret könnte sowohl die Aussagekraft der serologisch gemessenen Werte verbessern als auch die

Interpretation insbesondere im Vergleich zu den anderen sich mit Wundheilung befassenden Arbeiten erleichtern, welche nahezu ausschließlich Zytokinkonzentrationen im Wundsekret bestimmt haben. Ferner wäre eine gesunde, zweite, nicht-diabetische Kontrollgruppe sinnvoll. Leider zeigt sich bei ausführlicher Literaturrecherche, dass es derzeit kaum Arbeitsgruppen gibt, die sich mit dem Thema der Pathogenese der diabetischen Wundheilungsstörung beschäftigen.

4.4. Determinanten der Immunmediatoren

4.4.1. Einfluss des Wagner-Stadiums auf die Immunmediatoren

Wie zu erwarten war, bestand eine signifikante, positive Korrelation zwischen steigendem Wagner-Stadium und den Konzentrationen von CRP, Fibrinogen und IL-6 (Tabelle 8). Diese Assoziation ist unabhängig von klinischen und laborchemischen Parametern, auch wenn für CRP Einflussfaktoren wie Alter und Übergewicht ebenso wie Rauchen und Ernährung beschrieben worden sind¹⁵³. Die beiden letztgenannten Faktoren konnten in der Analyse nicht berücksichtigt werden, da Raucherstatus und Ernährungsgewohnheiten in der klinischen Datenbank nicht erfasst wurden.

Die Klassifikation nach Wagner orientiert sich an der Ulkustiefe, wobei dementsprechend tiefer reichende Ulzera mit einem höheren Grad an Inflammation und erhöhter IL-6-Expression einhergehen und somit höhere CRP- und Fibrinogen-Spiegel bedingen. Bei den übrigen Zytokinen zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Nach Adjustierung auf Kovariablen wie Alter, Geschlecht, Diabetes-Typ, Infektionsgrad, metabolische Marker und diabetische Folgeerkrankungen zeigten sich oben genannten Assoziationen stabil, die Regressionskoeffizienten zeigten eine nur geringe Veränderung. Damit hatten diese aus der Literatur bekannten Einflussfaktoren nur marginalen Einfluss auf die erhöhte Inflammation, was nahe legt, dass diese hauptsächlich durch die Wundschwere bedingt wird. Da es sich hier um eine Querschnittsstudie handelt, könnte aber auch umgekehrt die proinflammatorische Situation zumindest zum Teil für die Ausbildung der schweren Ulzera verantwortlich sein.

4.4.2. Einfluss des Infektionsgrades auf die Immunmediatoren

Eine gleichzeitig bestehende Infektion stellt in der Pathogenese von nicht-heilenden Wunden einen bedeutenden Faktor dar¹⁸⁸. Die Adjustierungen (Tabelle 9) zeigen jedoch, dass die erhöhten Zytokinspiegel nicht allein durch das gleichzeitige Vorliegen einer Infektion erklärt werden können, sondern die Wunde selbst maßgeblich zur erhöhten systemischen Inflammation beiträgt. Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass bakterielle Wundinfektionen nicht zu einer serologisch messbaren Erhöhung von CRP führen, es aber wohl im Wundsekret zur Erhöhung der IL-6-Konzentration kommt¹⁸⁹.

4.4.3. Einfluss klinischer Variablen auf die Schwere des diabetischen Fußsyndroms

Das Wagner-Stadium ist positiv mit der Liegezeit korreliert. Patienten mit höhergradigen Ulzera liegen signifikant länger im Krankenhaus. Hier fällt jedoch auf, dass die Liegezeit bei Patienten mit einem Ulkus im Wagner-Stadium 4 im Vergleich zu Patienten mit einem Ulkus in Wagner-Stadium 3 deutlich abfällt. Hier ist jedoch zu beachten, dass nur die Liegezeiten im DDZ erfasst wurden, nicht aber in anderen Kliniken, die Anschlussbehandlungen durchführten. Eine mögliche Erklärung für die kürzere Liegezeit wäre, dass Patienten im Wagner Stadium 4 häufiger zur interventionellen bzw. operativen Therapie aus unserem Haus verlegt worden sind, was die statistisch kürzere Liegezeit im DDZ trotz klinisch schwererer Wunden erklären kann.

Die ebenfalls zunächst unerwartete negative Korrelation des BMI mit steigenden Wagner-Stadien kann dadurch erklärt werden, dass die Komorbidität parallel zur Schwere des diabetischen Fußsyndroms anstieg: mit steigendem Wagner-Stadium steigt die Prävalenz an paVK, KHK und Schlaganfällen kontinuierlich an¹⁶⁵. Diese Assoziation erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, stellt doch die Adipositas einen bedeutsamen Risikofaktor für die genannten kardiovaskulären Krankheiten dar^{190;191}. Am Beispiel der paVK konnten bereits mehrere Studien, die im asiatischen Raum durchgeführt wurden, die in dieser Arbeit beschriebene Assoziation niedrigerer BMI-Werte mit dem Vorliegen einer paVK unter Typ 2 Diabetikern nachweisen¹⁹²⁻¹⁹⁴. Gleichwohl zeigte sich diese Assoziation auch in der United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)¹⁹⁵.

4.4.4. Einfluss klinischer Variablen auf den Verlauf der Immunmediatoren

In einer weiteren statistischen Analyse ergaben sich durch Adjustierung des Quotienten der Konzentrationen der verschiedenen Immunmarker von erster zu dritter Blutentnahme auf die klinischen Merkmale Alter, Geschlecht, Infektionsgrad, Wagner-Stadium und Diabetes-Typ folgende Befunde: Das Alter der Patienten hatte einen signifikanten, wenn auch geringen Einfluss auf den Verlauf der IL-6-Serumspiegel. Je älter die Patienten waren, desto stärker sind die IL-6-Spiegel im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes abgesunken. Das Geschlecht hatte einen Einfluss auf den IL-6-Verlauf. Bei weiblichen Patienten sanken die IL-6-Spiegel stärker ab als bei männlichen Patienten. Der Verlauf der CRP-Serumspiegel wurde ebenso durch das Wagner-Stadium beeinflusst. Höhere Wagner-Stadien waren mit einem stärkeren Abfall des Entzündungsmarkers CRP assoziiert.

4.5. Änderung der Inflammation im Heilungsverlauf

Der gewählte Beobachtungszeitraum von 14 Tagen erscheint bei einer medianen Wundheilungszeit von 6 Monaten⁴⁸ sehr kurz. Somit ist es schwierig, einen klaren Verlauf abzulesen, jedoch lässt sich bei verschiedenen Immunmarkern zumindest eine Tendenz erkennen.

Vor allem die Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen zeigten sich im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes wie zu erwarten rückläufig. Auch das proinflammatorische Zytokin IL-6 fällt im Verlauf der Behandlung signifikant ab, ebenso wie MIF und IL-18. Dies kann als direkte Folge des verminderten Entzündungsgeschehens im Bereich der Ulzera angesehen werden, wobei die Wunden in Bezug auf Größe und Tiefe zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme anhand der Wagner-Klassifikation leider nicht reevaluiert wurden. Damit fehlt ein valides Kriterium, um den Rückgang des Schweregrades und eine Heilung der Ulzera zu objektivieren und mit dem Verlauf der Inflammation in Beziehung zu setzen.

Gleichzeitig fällt auf, dass die Serumspiegel derjenigen Immunmarker, welche während des Krankenhausaufenthaltes einen signifikanten Rückgang zeigten, zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme im Vergleich zu den Kontrollpatienten immer noch signifikant erhöht waren. Dies resultiert möglicherweise aus dem sehr kurzen Beobachtungsintervall von 14 Tagen, in der die Ulzera zwar behandelt wurden, aber nicht vollständig abheilen konnten.

Eine mögliche Auswirkung einer bestehenden oder begonnenen pharmakologischen Therapie auf die vorliegende Inflammation kann nicht ausgeschlossen werden. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, wurden Studienteilnehmer, die Pharmaka mit offenkundig immunsuppressiver Wirkung wie z.B. Glukokortikoide, Azathioprin oder Tacrolimus einnahmen, von der Analyse ausgeschlossen. Darüber hinaus werden jedoch noch weiteren häufig angewandten Pharmaka immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben, die im Folgenden kurz diskutiert werden sollen.

Bei einem großen Teil (80%) der Patienten wurde bei oder nach stationärer Aufnahme eine antibiotische Therapie begonnen, so dass man vermuten kann, dass dies einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen genommen hat. Wie in Kapitel 4.4.2. jedoch gezeigt wurde, nimmt eine lokale Wundinfektion kaum Einfluss auf die systemische Konzentration der Immunmediatoren, so dass ein Effekt der Antibiotika auf die Inflammation durch die Reduktion der Infektion unwahrscheinlich erscheint.

Ein Drittel der Patienten wurde mit Statinen behandelt, für die bereits eine immunmodulatorische Wirkung beschrieben wurde^{196;197}. Die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Statine bewirkt eine vermehrte Differenzierung im Sinne einer Th2-Reaktion¹⁹⁸ und entwickelt hierüber einen antiinflammatorischen Effekt.

Auch die Betarezeptorenblocker scheinen immunmodulatorisch zu wirken, indem sie die proinflammatorische Wirkung der endogenen Agonisten abschwächen: Katecholamine führen zu einem Anstieg der zirkulierenden NK-Zellen und T-Lymphozyten¹⁹⁹. Fast 40% der Patienten standen unter antiadrenerger Therapie.

Gleichfalls wurden der Medikamentengruppe, die in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingreifen, immunmodulatorische Effekte nachgewiesen²⁰⁰. Hiermit wurden 95 (ACE-Hemmer) bzw. 15 (AT1-Antagonisten) Patienten behandelt. Rund ein Viertel der Patienten erhielten den Xanthin-Oxidase-Inhibitor Allopurinol, der die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α hemmt und ebenso über seine antioxidative Eigenschaft als Radikalfänger antiinflammatorisch wirkt²⁰¹.

In wieweit die immunmodulatorischen Eigenschaften der genannten Medikamente tatsächlich Einfluss auf den Verlauf der gemessenen Immunmediatoren genommen haben, kann aufgrund unvollständiger Daten über die Änderung der pharmakologischen Therapie während des stationären Aufenthalts nicht beantwortet werden. Ebenso wenig konnten all diejenigen Patienten ausgeschlossen werden, die medikamentös mit den genannten Pharmaka behandelt wurden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen Pharmaka als confounder wirken.

4.6. Studienlimitationen und Studienstärken

Abschließend sollen die Schwächen und Stärken dieser Arbeit kurz angesprochen werden. Zum einen ist diese Arbeit als Querschnittsstudie angelegt worden, so dass keine Ursache- und Wirkungsaussagen möglich sind. Um die kausale Rolle der Immunmediatoren für die Entwicklung des DFS besser zu charakterisieren, wären longitudinale Studien mit Diabetespatienten notwendig, die initial kein DFS aufweisen. Zum anderen kann die ungleiche Verteilung von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern als weiteren Kritikpunkt aufgeführt werden. Daher gelten die hier erhobenen Daten im Wesentlichen für Patienten mit Typ 2 Diabetes. Für Patienten mit Typ 1 Diabetes wären vergleichbare Studien wünschenswert, um herauszufinden, ob es in der Assoziation zwischen subklinischer Inflammation und DFS eventuell Unterschiede zwischen den Diabetestypen gibt. Darüber hinaus wäre eine längere Nachbeobachtung der Probanden interessant, da so die Rolle der subklinischen Inflammation für die Langzeit-Prognose besser untersucht werden könnte.

Demgegenüber stehen einige Stärken dieser Arbeit, die nicht unerwähnt bleiben sollen. Die Studie schloss eine relativ große Anzahl von Patienten und Kontrollen ein, die alle umfangreich immunologisch phänotypisiert wurden. Eine vergleichbar intensive immunologische Untersuchung von DFS-Patienten liegt bislang noch nicht vor. Zudem war eine Reihe von weiteren Daten über die Studienteilnehmer verfügbar, so dass in multivariaten Analysen auch der Einfluss möglicher Confounder auf die Assoziation zwischen subklinischer Entzündung und DFS untersucht werden konnte.

4.7. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hochsignifikante Assoziation zwischen subklinischer, systemischer Inflammation und dem diabetischen Fußsyndrom besteht. Als wichtigster Parameter, der mit den Immunmediatorkonzentrationen assoziiert ist, konnte der klinische Schweregrad des diabetischen Fußsyndroms (anhand des Wagner-Stadiums) identifiziert werden.

Die Tatsache, dass dem Typ 2 Diabetes ein inflammatorisches Geschehen zu Grunde liegt, sowie die Identifikation der Mediatoren dieses Geschehens eröffnen neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. In Zukunft könnte abseits der

auf Lebensstil basierten Erfassung auch eine immunologische Risikoabschätzung für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes möglich sein. Ferner bieten sich neue Therapieoptionen des von vielen Autoren als „Epidemie des 21. Jahrhunderts“ beschriebenen Diabetes mellitus Typ 2 an. In einer ersten klinischen Studie konnten durch 3-monatige, tägliche Gabe des IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten Anakinra sowohl die sekretorische β -Zellfunktion und die Blutzuckerspiegel verbessert als auch die systemische Inflammation reduziert werden²⁰². Entgegen der Erwartungen zeigte sich trotz der antiinflammatorischen Therapie kein Effekt auf die Insulinresistenz, wohl aber eine Verbesserung der Insulinsekretion.

Bezüglich der diabetischen Wundheilungsstörung wurden erste Therapieveruche mit antiinflammatorischen Substanzen im Tierversuch unternommen. Durch Gabe eines TNF- α -Antikörpers konnte bei ob/ob-Mäusen sowohl die Wundheilung verkürzt als auch die Insulinsensitivität verbessert werden²⁰³. Eventuell kann in Zukunft auch beim Menschen die dem diabetischen Fußsyndrom zugrunde liegende Wundheilungsstörung durch medikamentöse Immunmodulation – sei es durch Steigerung oder Suppression – verbessert werden. So würde ein weiteres innovatives Therapiekonzept zur Verfügung stehen, was in besonders schweren Fällen eine Alternative zu Operation und drohender Amputation bieten könnte, aber ebenso in leichten Fällen die Wundheilungszeit entscheidend verkürzen könnte und eventuell sogar in der Prävention neuer Ulzera wirksam wäre.

Allen wissenschaftlichen Erfolgen zum Trotz muss aufgrund der steigenden Inzidenz des Typ 2 Diabetes gesundheitspolitisch der Prävention der Grunderkrankung sowie der Vielzahl an Folgeerkrankungen eine zunehmend größere Bedeutung zuerkannt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Jeffcoate WJ, Macfarlane R M, Fletcher E M. 1993. **The description and classification of diabetic foot lesions.** *Diabet Med* 10: 676-679.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care* 27: 1047-1053.
3. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. 2005. **The global burden of diabetic foot disease.** *Lancet* 366: 1719-1724.
4. Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch D K, Sandhu N, Reiber G E, Wagner E H. 1999. **Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes.** *Diabetes Care* 22: 382-387.
5. Henriksson F, Agardh C D, Berne C, Bolinder J, Lonnqvist F, Stenstrom P, Ostenson C G, Jonsson B. 2000. **Direct medical costs for patients with type 2 diabetes in Sweden.** *J Intern Med* 248: 387-396.
6. Abbott CA, Carrington A L, Ashe H, Bath S, Every L C, Griffiths J, Hann A W, Hussein A, Jackson N, Johnson K E, Ryder C H, Torkington R, Van Ross E R, Whalley A M, Widdows P, Williamson S, Boulton A J. 2002. **The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort.** *Diabet Med* 19: 377-384.
7. Reiber GE, Lipsky B A, Gibbons G W. 1998. **The burden of diabetic foot ulcers.** *Am J Surg* 176: 5S-10S.
8. Lavery LA, Armstrong D G, Wunderlich R P, Tredwell J, Boulton A J. 2003. **Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort.** *Diabetes Care* 26: 1435-1438.
9. Herber OR, Schnepf W, Rieger M A. 2007. **A systematic review on the impact of leg ulceration on patients' quality of life.** *Health Qual Life Outcomes* 5: 44.
10. Ragnarson TG, Apelqvist J. 2004. **Health-economic consequences of diabetic foot lesions.** *Clin Infect Dis* 39 Suppl 2: S132-S139.
11. Saar WE, Lee T H, Berlet G C. 2005. **The economic burden of diabetic foot and ankle disorders.** *Foot Ankle Int* 26: 27-31.
12. New JP, McDowell D, Burns E, Young R J. 1998. **Problem of amputations in patients with newly diagnosed diabetes mellitus.** *Diabet Med* 15: 760-764.
13. Boulton AJ, Vileikyte L. 2000. **The diabetic foot: the scope of the problem.** *J Fam Pract* 49: S3-S8.
14. Williams DR. 1985. **Hospital admissions of diabetic patients: information from hospital activity analysis.** *Diabet Med* 2: 27-32.
15. Heller G, Gunster C, Swart E. 2005. **[The frequency of lower limb amputations in Germany].** *Dtsch Med Wochenschr* 130: 1689-1690.

16. Rumenapf G, Dittler S, Morbach S, Amendt K, Radu A. 2008. **[The vascular surgeon's role in interdisciplinary treatment of diabetic foot syndrome.]**. *Chirurg*.
17. Lavery LA, Ashry H R, van Houtum W, Pugh J A, Harkless L B, Basu S. 1996. **Variation in the incidence and proportion of diabetes-related amputations in minorities**. *Diabetes Care* 19: 48-52.
18. Boyko EJ, Ahroni J H, Smith D G, Davignon D. 1996. **Increased mortality associated with diabetic foot ulcer**. *Diabet Med* 13: 967-972.
19. Lavery LA, Armstrong D G, Vela S A, Quebedeaux T L, Fleischli J G. 1998. **Practical criteria for screening patients at high risk for diabetic foot ulceration**. *Arch Intern Med* 158: 157-162.
20. Boyko EJ, Ahroni J H, Stensel V, Forsberg R C, Davignon D R, Smith D G. 1999. **A prospective study of risk factors for diabetic foot ulcer. The Seattle Diabetic Foot Study**. *Diabetes Care* 22: 1036-1042.
21. Pham H, Armstrong D G, Harvey C, Harkless L B, Giurini J M, Veves A. 2000. **Screening techniques to identify people at high risk for diabetic foot ulceration: a prospective multicenter trial**. *Diabetes Care* 23: 606-611.
22. Reiber GE, Vileikyte L, Boyko E J, del Aguila M, Smith D G, Lavery L A, Boulton A J. 1999. **Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings**. *Diabetes Care* 22: 157-162.
23. Lobmann R, Kasten G, Kasten U, Lehnert H. 2002. **Association of increased plantar pressures with peripheral sensorimotor and peripheral autonomic neuropathy in Type 2 diabetic patients**. *Diabetes Nutr Metab* 15: 165-168.
24. Armstrong DG, Lavery L A, Harkless L B. 1998. **Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation**. *Diabetes Care* 21: 855-859.
25. Said G. 2007. **Diabetic neuropathy--a review**. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 331-340.
26. Brownlee M. 2001. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications**. *Nature* 414: 813-820.
27. Sheetz MJ, King G L. 2002. **Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications**. *JAMA* 288: 2579-2588.
28. Brownlee M. 2005. **The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism**. *Diabetes* 54: 1615-1625.
29. Figueroa-Romero C, Sadidi M, Feldman E L. 2008. **Mechanisms of disease: The oxidative stress theory of diabetic neuropathy**. *Rev Endocr Metab Disord*.
30. Young MJ, Boulton A J, MacLeod A F, Williams D R, Sonksen P H. 1993. **A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population**. *Diabetologia* 36: 150-154.
31. Bruce SG, Young T K. 2008. **Prevalence and risk factors for neuropathy in a Canadian First Nation community**. *Diabetes Care* 31: 1837-1841.

32. Eckhardt A, Lobmann R. Diagnostik. In: **Der diabetische Fuß**. Springer Verlag, 2005; 1. Auflage: 58-67.
33. Hile C, Veves A. 2003. **Diabetic neuropathy and microcirculation**. *Curr Diab Rep* 3: 446-451.
34. Dinh T, Veves A. 2005. **Microcirculation of the diabetic foot**. *Curr Pharm Des* 11: 2301-2309.
35. Creager MA, Luscher T F, Cosentino F, Beckman J A. 2003. **Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I**. *Circulation* 108: 1527-1532.
36. Luscher TF, Creager M A, Beckman J A, Cosentino F. 2003. **Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II**. *Circulation* 108: 1655-1661.
37. Selvin E, Erlinger T P. 2004. **Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000**. *Circulation* 110: 738-743.
38. Eason SL, Petersen N J, Suarez-Almazor M, Davis B, Collins T C. 2005. **Diabetes mellitus, smoking, and the risk for asymptomatic peripheral arterial disease: whom should we screen?** *J Am Board Fam Pract* 18: 355-361.
39. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati F L, Powe N R, Golden S H. 2004. **Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus**. *Ann Intern Med* 141: 421-431.
40. Ness J, Aronow W S, Newkirk E, McDanel D. 2005. **Prevalence of symptomatic peripheral arterial disease, modifiable risk factors, and appropriate use of drugs in the treatment of peripheral arterial disease in older persons seen in a university general medicine clinic**. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 255-257.
41. van der Feen C, Neijens F S, Kanters S D, Mali W P, Stolk R P, Banga J D. 2002. **Angiographic distribution of lower extremity atherosclerosis in patients with and without diabetes**. *Diabet Med* 19: 366-370.
42. International Working Group on the Diabetic Foot. 2007. **International Consensus on the Diabetic Foot & Practical Guidelines**
43. Morbach, S, Müller, E, Reike, H, Risse, A, and Spraul, M. 2006. **Leitlinie Diabetisches Fußsyndrom**. *Diabetes und Stoffwechsel* 13 (Suppl. 2): 9-30
44. Rith-Najarian SJ, Stolusky T, Gohdes D M. 1992. **Identifying diabetic patients at high risk for lower-extremity amputation in a primary health care setting. A prospective evaluation of simple screening criteria**. *Diabetes Care* 15: 1386-1389.
45. Boulton AJ, Gries F A, Jervell J A. 1998. **Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy**. *Diabet Med* 15: 508-514.
46. Zimny S, Schatz H, Pfohl M. 2002. **Determinants and estimation of healing times in diabetic foot ulcers**. *J Diabetes Complications* 16: 327-332.

47. Ince P, Game F L, Jeffcoate W J. 2007. **Rate of healing of neuropathic ulcers of the foot in diabetes and its relationship to ulcer duration and ulcer area.** *Diabetes Care* 30: 660-663.
48. Treece KA, Macfarlane R M, Pound N, Game F L, Jeffcoate W J. 2004. **Validation of a system of foot ulcer classification in diabetes mellitus.** *Diabet Med* 21: 987-991.
49. Holstein P, Ellitsgaard N, Olsen B B, Ellitsgaard V. 2000. **Decreasing incidence of major amputations in people with diabetes.** *Diabetologia* 43: 844-847.
50. Jeffcoate WJ. 2006. **The evidence base to guide the use of antibiotics in foot ulcers in people with diabetes is thin, but what are we going to do about it?** *Diabet Med* 23: 339-340.
51. Steed DL, Donohoe D, Webster M W, Lindsley L. 1996. **Effect of extensive debridement and treatment on the healing of diabetic foot ulcers.** *Diabetic Ulcer Study Group. J Am Coll Surg* 183: 61-64.
52. Rai NK, Suryabhan, Ansari M, Kumar M, Shukla V K, Tripathi K. 2005. **Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds.** *J Wound Care* 14: 277-281.
53. Siitonen OI, Niskanen L K, Laakso M, Siitonen J T, Pyorala K. 1993. **Lower-extremity amputations in diabetic and nondiabetic patients. A population-based study in eastern Finland.** *Diabetes Care* 16: 16-20.
54. Trautner C, Haastert B, Giani G, Berger M. 1996. **Incidence of lower limb amputations and diabetes.** *Diabetes Care* 19: 1006-1009.
55. Canavan RJ, Unwin N C, Kelly W F, Connolly V M. 2008. **Diabetes- and nondiabetes-related lower extremity amputation incidence before and after the introduction of better organized diabetes foot care: continuous longitudinal monitoring using a standard method.** *Diabetes Care* 31: 459-463.
56. Adler AI, Boyko E J, Ahroni J H, Smith D G. 1999. **Lower-extremity amputation in diabetes. The independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers.** *Diabetes Care* 22: 1029-1035.
57. Nather A, Bee C S, Huak C Y, Chew J L, Lin C B, Neo S, Sim E Y. 2008. **Epidemiology of diabetic foot problems and predictive factors for limb loss.** *J Diabetes Complications* 22: 77-82.
58. Moustafa M, Bullock A J, Creagh F M, Heller S, Jeffcoate W, Game F, Amery C, Tesfaye S, Ince Z, Haddow D B, MacNeil S. 2007. **Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers.** *Regen Med* 2: 887-902.
59. Papanas N, Maltezos E. 2007. **Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises?** *Int J Low Extrem Wounds* 6: 37-53.
60. Bonn D. 2000. **Maggot therapy: an alternative for wound infection.** *Lancet* 356: 1174.

61. Veves A, Sheehan P, Pham H T. 2002. **A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers.** *Arch Surg* 137: 822-827.
62. Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S. 2004. **Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds.** *Cochrane Database Syst Rev* CD004123.
63. Eneroth M, van Houtum W H. 2008. **The value of debridement and Vacuum-Assisted Closure (V.A.C.) Therapy in diabetic foot ulcers.** *Diabetes Metab Res Rev* 24 Suppl 1: S76-S80.
64. World Health Organisation, International Diabetes Federation. 1990. **Diabetes care and research in Europe: The Saint Vincent Declaration**
65. Trautner C, Haastert B, Spraul M, Giani G, Berger M. 2001. **Unchanged incidence of lower-limb amputations in a German City, 1990-1998.** *Diabetes Care* 24: 855-859.
66. Heller G, Gunster C, Schellschmidt H. 2004. **[How frequent are diabetes-related amputations of the lower limbs in Germany? An analysis on the basis of routine data].** *Dtsch Med Wochenschr* 129: 429-433.
67. Singh N, Armstrong D G, Lipsky B A. 2005. **Preventing foot ulcers in patients with diabetes.** *JAMA* 293: 217-228.
68. Lavery LA, Peters E J, Armstrong D G. 2008. **What are the most effective interventions in preventing diabetic foot ulcers?** *Int Wound J* 5: 425-433.
69. Falanga V. 2005. **Wound healing and its impairment in the diabetic foot.** *Lancet* 366: 1736-1743.
70. Loots MA, Lamme E N, Zeegelaar J, Mekkes J R, Bos J D, Middelkoop E. 1998. **Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds.** *J Invest Dermatol* 111: 850-857.
71. Furie MB, Randolph G J. 1995. **Chemokines and tissue injury.** *Am J Pathol* 146: 1287-1301.
72. Sweitzer SM, Fann S A, Borg T K, Baynes J W, Yost M J. 2006. **What is the future of diabetic wound care?** *Diabetes Educ* 32: 197-210.
73. Ochoa O, Torres F M, Shireman P K. 2007. **Chemokines and diabetic wound healing.** *Vascular* 15: 350-355.
74. Rayment EA, Upton Z, Shooter G K. 2008. **Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer.** *Br J Dermatol* 158: 951-961.
75. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. 2005. **Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications.** *Diabetes Care* 28: 461-471.
76. Holzheimer RG, Steinmetz W. 2000. **Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds.** *Eur J Med Res* 5: 347-355.

77. Low QE, Drugea I A, Duffner L A, Quinn D G, Cook D N, Rollins B J, Kovacs E J, DiPietro L A. 2001. **Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice.** *Am J Pathol* 159: 457-463.
78. DiPietro LA, Burdick M, Low Q E, Kunkel S L, Strieter R M. 1998. **MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair.** *J Clin Invest* 101: 1693-1698.
79. Werner S, Grose R. 2003. **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** *Physiol Rev* 83: 835-870.
80. Hardman MJ, Waite A, Zeef L, Burow M, Nakayama T, Ashcroft G S. 2005. **Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing.** *Am J Pathol* 167: 1561-1574.
81. Goodson WH, III, Hunt T K. 1977. **Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus.** *J Surg Res* 22: 221-227.
82. Turina M, Fry D E, Polk H C, Jr. 2005. **Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects.** *Crit Care Med* 33: 1624-1633.
83. Ahmed N. 2005. **Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications.** *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.
84. Yu P, Yu D M, Qi J C, Wang J, Zhang Q M, Zhang J Y, Tang Y Z, Xing Q L, Li M Z. 2006. **[High D-glucose alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis dysfunction].** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86: 3425-3430.
85. Velander P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, Hoeller D, Gheerardyn R, Chen M, Visovatti S, Svensson H, Yao F, Eriksson E. 2008. **Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia.** *Wound Repair Regen* 16: 288-293.
86. Laing T, Hanson R, Chan F, Bouchier-Hayes D. 2007. **The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of impaired diabetic wound healing: a novel therapeutic target?** *Med Hypotheses* 69: 1029-1031.
87. Hadi HA, Suwaidi J A. 2007. **Endothelial dysfunction in diabetes mellitus.** *Vasc Health Risk Manag* 3: 853-876.
88. Kolb H, Mandrup-Poulsen T. 2005. **An immune origin of type 2 diabetes?** *Diabetologia* 48: 1038-1050.
89. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. 2004. **Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.** *Trends Immunol* 25: 4-7.
90. Ruan H, Lodish H F. 2003. **Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha.** *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 447-455.
91. Fernandez-Real JM, Ricart W. 2003. **Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome.** *Endocr Rev* 24: 278-301.

92. Senn JJ, Klover P J, Nowak I A, Zimmers T A, Koniaris L G, Furlanetto R W, Mooney R A. 2003. **Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes.** *J Biol Chem* 278: 13740-13746.
93. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White M F. 2002. **SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2.** *J Biol Chem* 277: 42394-42398.
94. Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun T H, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K. 1999. **Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones.** *Diabetologia* 42: 702-710.
95. DeFronzo RA. 1988. **Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM.** *Diabetes* 37: 667-687.
96. Donath MY, Ehses J A, Maedler K, Schumann D M, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M. 2005. **Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes.** *Diabetes* 54 Suppl 2: S108-S113.
97. Pickup JC, Mattock M B, Chusney G D, Burt D. 1997. **NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X.** *Diabetologia* 40: 1286-1292.
98. Pickup JC, Crook M A. 1998. **Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?** *Diabetologia* 41: 1241-1248.
99. Schmidt MI, Duncan B B, Sharrett A R, Lindberg G, Savage P J, Offenbacher S, Azambuja M I, Tracy R P, Heiss G. 1999. **Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study.** *Lancet* 353: 1649-1652.
100. Pradhan AD, Manson J E, Rifai N, Buring J E, Ridker P M. 2001. **C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.** *JAMA* 286: 327-334.
101. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert S R, Cushman M, Kuller L H, Resnick H E, Tracy R P. 2001. **The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study.** *Diabetes* 50: 2384-2389.
102. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H. 2002. **Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors.** *Diabetologia* 45: 805-812.
103. Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Lean M E, Haffner S M. 2002. **Prospective study of C-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study.** *Diabetes Care* 25: 2016-2021.
104. Festa A, D'Agostino R, Jr., Tracy R P, Haffner S M. 2002. **Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development**

- of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study.** *Diabetes* 51: 1131-1137.
105. Freeman DJ, Norrie J, Caslake M J, Gaw A, Ford I, Lowe G D, O'Reilly D S, Packard C J, Sattar N. 2002. **C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study.** *Diabetes* 51: 1596-1600.
106. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann M M, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer A F. 2003. **Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.** *Diabetes* 52: 812-817.
107. Snijder MB, Dekker J M, Visser M, Stehouwer C D, Yudkin J S, Bouter L M, Heine R J, Nijpels G, Seidell J C. 2003. **Prospective relation of C-reactive protein with type 2 diabetes: response to Han et al.** *Diabetes Care* 26: 1656-1657.
108. Hu FB, Meigs J B, Li T Y, Rifai N, Manson J E. 2004. **Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women.** *Diabetes* 53: 693-700.
109. Thorand B, Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C, Illig T, Martin S, Herder C. 2005. **Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002.** *Diabetes* 54: 2932-2938.
110. Herder C, Baumert J, Thorand B, Koenig W, de Jager W, Meisinger C, Illig T, Martin S, Kolb H. 2006. **Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002.** *Diabetologia* 49: 921-929.
111. Herder C, Klopp N, Baumert J, Muller M, Khuseyinova N, Meisinger C, Martin S, Illig T, Koenig W, Thorand B. 2008. **Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene variants and MIF serum concentrations on the risk of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Case-Cohort Study, 1984-2002.** *Diabetologia* 51: 276-284.
112. Greenfield JR, Campbell L V. 2006. **Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'?** *Curr Diabetes Rev* 2: 195-211.
113. Santos LL, Morand E F. 2006. **The role of macrophage migration inhibitory factor in the inflammatory immune response and rheumatoid arthritis.** *Wien Med Wochenschr* 156: 11-18.
114. Gerhardt CC, Romero I A, Canello R, Camoin L, Strosberg A D. 2001. **Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes.** *Mol Cell Endocrinol* 175: 81-92.
115. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel R L, Ferrante A W, Jr. 2006. **CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding.** *J Clin Invest* 116: 115-124.
116. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. 2006. **MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity.** *J Clin Invest* 116: 1494-1505.

117. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S. 2000. **Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes.** *Clin Exp Immunol* 121: 437-443.
118. Herder C, Haastert B, Muller-Scholze S, Koenig W, Thorand B, Holle R, Wichmann H E, Scherbaum W A, Martin S, Kolb H. 2005. **Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4).** *Diabetes* 54 Suppl 2: S11-S17.
119. Cohen S, Bigazzi P E, Yoshida T. 1974. **Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production.** *Cell Immunol* 12: 150-159.
120. Cohen S. 2004. **Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago.** *Cytokine* 28: 242-247.
121. Allen SJ, Crown S E, Handel T M. 2007. **Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism.** *Annu Rev Immunol* 25: 787-820.
122. Fernandez EJ, Lolis E. 2002. **Structure, function, and inhibition of chemokines.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-499.
123. Tayal V, Kalra B S. 2008. **Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update.** *Eur J Pharmacol* 579: 1-12.
124. Fontana L, Eagon J C, Trujillo M E, Scherer P E, Klein S. 2007. **Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans.** *Diabetes* 56: 1010-1013.
125. Paquet P, Pierard G E. 1996. **Interleukin-6 and the skin.** *Int Arch Allergy Immunol* 109: 308-317.
126. David JR. 1966. **Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 56: 72-77.
127. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger J A, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz C N, Nicod P, Bucala R. 1997. **Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4782-4787.
128. Yabunaka N, Nishihira J, Mizue Y, Tsuji M, Kumagai M, Ohtsuka Y, Imamura M, Asaka M. 2000. **Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 23: 256-258.
129. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, . 1995. **Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.** *Nature* 378: 88-91.
130. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. 2001. **Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.** *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 53-72.

131. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A. 2001. **Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability.** *Circulation* 104: 1598-1603.
132. Lewis EC, Dinarello C A. 2006. **Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16852-16857.
133. Colditz I, Zwahlen R, Dewald B, Baggiolini M. 1989. **In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes.** *Am J Pathol* 134: 755-760.
134. Baggiolini M, Moser B, Clark-Lewis I. 1994. **Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture.** *Chest* 105: 95S-98S.
135. Koch AE, Polverini P J, Kunkel S L, Harlow L A, DiPietro L A, Elner V M, Elner S G, Strieter R M. 1992. **Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.** *Science* 258: 1798-1801.
136. Kim CS, Park H S, Kawada T, Kim J H, Lim D, Hubbard N E, Kwon B S, Erickson K L, Yu R. 2006. **Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters.** *Int J Obes (Lond)* 30: 1347-1355.
137. Lee SC, Brummet M E, Shahabuddin S, Woodworth T G, Georas S N, Leiferman K M, Gilman S C, Stellato C, Gladue R P, Schleimer R P, Beck L A. 2000. **Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes.** *J Immunol* 164: 3392-3401.
138. Koch AE, Kunkel S L, Harlow L A, Mazarakis D D, Haines G K, Burdick M D, Pope R M, Strieter R M. 1994. **Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis.** *J Clin Invest* 93: 921-928.
139. Boven LA, Montagne L, Nottet H S, De Groot C J. 2000. **Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions.** *Clin Exp Immunol* 122: 257-263.
140. Charo IF, Ransohoff R M. 2006. **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.** *N Engl J Med* 354: 610-621.
141. Libby P. 2002. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature* 420: 868-874.
142. Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J. 2006. **Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle.** *Endocrinology* 147: 2458-2467.
143. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. 1997. **The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily.** *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 207-219.

144. Herder C, Hauner H, Kempf K, Kolb H, Skurk T. 2007. **Constitutive and regulated expression and secretion of interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) in human adipocytes.** *Int J Obes (Lond)* 31: 403-410.
145. Taub DD, Lloyd A R, Conlon K, Wang J M, Ortaldo J R, Harada A, Matsushima K, Kelvin D J, Oppenheim J J. 1993. **Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells.** *J Exp Med* 177: 1809-1814.
146. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub D D, Liao F, Farber J M, Maheshwari S, Kleinman H K, Reaman G H, Tosato G. 1995. **Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo.** *J Exp Med* 182: 155-162.
147. Mach F, Sauty A, Iarossi A S, Sukhova G K, Neote K, Libby P, Luster A D. 1999. **Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells.** *J Clin Invest* 104: 1041-1050.
148. Balashov KE, Rottman J B, Weiner H L, Hancock W W. 1999. **CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6873-6878.
149. Xu H, Nakayama K, Ogawa S, Sugiura A, Kato T, Sato T, Sato H, Ito S. 2005. **[Elevated plasma concentration of IP-10 in patients with type 2 diabetes mellitus].** *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 47: 524-530.
150. Appay V, Rowland-Jones S L. 2001. **RANTES: a versatile and controversial chemokine.** *Trends Immunol* 22: 83-87.
151. Wu H, Ghosh S, Perrard X D, Feng L, Garcia G E, Perrard J L, Sweeney J F, Peterson L E, Chan L, Smith C W, Ballantyne C M. 2007. **T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity.** *Circulation* 115: 1029-1038.
152. Tillett, W, Francis, T. 1930. **Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus.** *J Exp Med*
153. Marnell L, Mold C, Du Clos T W. 2005. **C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation.** *Clin Immunol* 117: 104-111.
154. Kaplan MH, Volanakis J E. 1974. **Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin.** *J Immunol* 112: 2135-2147.
155. Danesh J, Lewington S, Thompson S G, Lowe G D, Collins R, Kostis J B, Wilson A C, Folsom A R, Wu K, Benderly M, Goldbourt U, Willeit J, Kiechl S, Yarnell J W, Sweetnam P M, Elwood P C, Cushman M, Psaty B M, Tracy R P, Tybjaerg-Hansen A, Haverkate F, de Maat M P, Fowkes F G, Lee A J, Smith F B, Salomaa V, Harald K, Rasi R, Vahtera E, Jousilahti P, Pekkanen J, D'Agostino R, Kannel W B, Wilson P W, Tofler G, Arocha-Pinango C L, Rodriguez-Larralde A, Nagy E, Mijares M, Espinosa R, Rodriguez-Roa E, Ryder E, Diez-Ewald M P, Campos G, Fernandez V, Torres E, Marchioli R, Valagussa F, Rosengren A, Wilhelmsen L, Lappas G, Eriksson H, Cremer P, Nagel D, Curb J D, Rodriguez B, Yano K, Salonen J T,

- Nyyssonen K, Tuomainen T P, Hedblad B, Lind P, Loewel H, Koenig W, Meade T W, Cooper J A, De Stavola B, Knottenbelt C, Miller G J, Cooper J A, Bauer K A, Rosenberg R D, Sato S, Kitamura A, Naito Y, Palosuo T, Ducimetiere P, Amouyel P, Arveiler D, Evans A E, Ferrieres J, Juhan-Vague I, Bingham A, Schulte H, Assmann G, Cantin B, Lamarche B, Despres J P, Dagenais G R, Tunstall-Pedoe H, Woodward M, Ben Shlomo Y, Davey S G, Palmieri V, Yeh J L, Rudnicka A, Ridker P, Rodeghiero F, Tosoletto A, Shepherd J, Ford I, Robertson M, Brunner E, Shipley M, Feskens E J, Kromhout D, Dickinson A, Ireland B, Juzwishin K, Kaptoge S, Lewington S, Memon A, Sarwar N, Walker M, Wheeler J, White I, Wood A. 2005. **Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis.** *JAMA* 294: 1799-1809.
156. Best LG, North K E, Li X, Palmieri V, Umans J G, MacCluer J, Laston S, Haack K, Goring H, Diego V P, Almasy L, Lee E T, Tracy R P, Cole S. 2008. **Linkage study of fibrinogen levels: the Strong Heart Family Study.** *BMC Med Genet* 9: 77.
157. Kerner, W, Brückel, J, and Kiess, W. 2004. **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus.** Deutsche Diabetes Gesellschaft DDG, November 2004. Herausgeber: W. A. Scherbaum, W. Kiess. Aktualisierung der 1. Auflage vom Juli 2001.
158. Wagner FW, Jr. 1981. **The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment.** *Foot Ankle* 2: 64-122.
159. Coussens LM, Werb Z. 2002. **Inflammation and cancer.** *Nature* 420: 860-867.
160. Newrick P. 2000. **International consensus on the diabetic foot.** *BMJ* 321: 642A.
161. Harris IR, Yee K C, Walters C E, Cunliffe W J, Kearney J N, Wood E J, Ingham E. 1995. **Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers.** *Exp Dermatol* 4: 342-349.
162. Pinto A, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Fernandez P, La Placa S, Di Gati M, Licata G. 2008. **Cardiovascular risk profile and morbidity in subjects affected by type 2 diabetes mellitus with and without diabetic foot.** *Metabolism* 57: 676-682.
163. Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, Jude E, Piaggese A, Bakker K, Edmonds M, Holstein P, Jirkovska A, Mauricio D, Tennvall G R, Reike H, Spraul M, Uccioli L, Urbancic V, Van Acker K, Van Baal J, Van Merode F, Schaper N. 2007. **Optimal organization of health care in diabetic foot disease: introduction to the Eurodiale study.** *Int J Low Extrem Wounds* 6: 11-17.
164. Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, Jude E, Piaggese A, Bakker K, Edmonds M, Holstein P, Jirkovska A, Mauricio D, Ragnarson T G, Reike H, Spraul M, Uccioli L, Urbancic V, Van Acker K, Van Baal J, Van Merode F, Schaper N. 2007. **High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study.** *Diabetologia* 50: 18-25.
165. Apelqvist J. 2008. **The foot in perspective.** *Diabetes Metab Res Rev* 24 Suppl 1: S110-S115.

166. Boulton A J. The pathway to ulceration: aetiopathogenesis. In: **The foot in diabetes**. (Eds. Boulton A, Conner H, Cavannagh P). John Wiley and Sons Ltd, 2006; 3rd edition.
167. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. 2004. **C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease**. *Inflamm Bowel Dis* 10: 661-665.
168. Schultz DR, Arnold P I. 1990. **Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen**. *Semin Arthritis Rheum* 20: 129-147.
169. Ballou SP, Lozanski G. 1992. **Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein**. *Cytokine* 4: 361-368.
170. Hanriot D, Bello G, Ropars A, Seguin-Devaux C, Poitevin G, Grosjean S, Latger-Cannard V, Devaux Y, Zannad F, Regnault V, Lacolley P, Mertes P M, Hess K, Longrois D. 2008. **C-reactive protein induces pro- and anti-inflammatory effects, including activation of the liver X receptor alpha, on human monocytes**. *Thromb Haemost* 99: 558-569.
171. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. 2003. **Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice**. *J Leukoc Biol* 73: 713-721.
172. Gallucci RM, Simeonova P P, Matheson J M, Kommineni C, Guriel J L, Sugawara T, Luster M I. 2000. **Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice**. *FASEB J* 14: 2525-2531.
173. Lockett LR, Gallucci R M. 2007. **Interleukin-6 (IL-6) modulates migration and matrix metalloproteinase function in dermal fibroblasts from IL-6KO mice**. *Br J Dermatol* 156: 1163-1171.
174. Tian YW, Stacey M C. 2003. **Cytokines and growth factors in keratinocytes and sweat glands in chronic venous leg ulcers. An immunohistochemical study**. *Wound Repair Regen* 11: 316-325.
175. Fahey TJ, III, Sadaty A, Jones W G, Barber A, Smoller B, Shires G T. 1991. **Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing**. *J Surg Res* 50: 308-313.
176. Calandra T, Spiegel L A, Metz C N, Bucala R. 1998. **Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11383-11388.
177. Herder C, Kolb H, Koenig W, Haastert B, Muller-Scholze S, Rathmann W, Holle R, Thorand B, Wichmann H E. 2006. **Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4)**. *Diabetes Care* 29: 368-371.
178. Gilliver SC, Ruckshanthi J P, Hardman M J, Nakayama T, Ashcroft G S. 2008. **Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor**. *Endocrinology* [Epub ahead of print].

179. Dao H, Jr., Kazin R A. 2007. **Gender differences in skin: a review of the literature.** *Gen Med* 4: 308-328.
180. Bodnar RJ, Yates C C, Wells A. 2006. **IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain.** *Circ Res* 98: 617-625.
181. Luster AD, Cardiff R D, MacLean J A, Crowe K, Granstein R D. 1998. **Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine.** *Proc Assoc Am Physicians* 110: 183-196.
182. Fahey TJ, III, Sherry B, Tracey K J, van Deventer S, Jones W G, Minei J P, Morgello S, Shires G T, Cerami A. 1990. **Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1.** *Cytokine* 2: 92-99.
183. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski W L. 2006. **Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers.** *Wound Repair Regen* 14: 558-565.
184. Bruun JM, Lihn A S, Madan A K, Pedersen S B, Schiott K M, Fain J N, Richelsen B. 2004. **Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E8-13.
185. Simonet WS, Hughes T M, Nguyen H Q, Trebasky L D, Danilenko D M, Medlock E S. 1994. **Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8.** *J Clin Invest* 94: 1310-1319.
186. Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. 2008. **Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging.** *Ageing Res Rev* 7: 83-105.
187. Chung HY, Sung B, Jung K J, Zou Y, Yu B P. 2006. **The molecular inflammatory process in aging.** *Antioxid Redox Signal* 8: 572-581.
188. Jeffcoate WJ, Harding K G. 2003. **Diabetic foot ulcers.** *Lancet* 361: 1545-1551.
189. Ambrosch A, Lobmann R, Pott A, Preissler J. 2008. **Interleukin-6 concentrations in wound fluids rather than serological markers are useful in assessing bacterial triggers of ulcer inflammation.** *Int Wound J* 5: 99-106.
190. Katzmarzyk PT, Church T S, Janssen I, Ross R, Blair S N. 2005. **Metabolic syndrome, obesity, and mortality: impact of cardiorespiratory fitness.** *Diabetes Care* 28: 391-397.
191. Siqueira AF, Almeida-Pititto B, Ferreira S R. 2007. **[Cardiovascular disease in diabetes mellitus: classical and non-classical risk factors].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51: 257-267.
192. Tseng CH. 2003. **Prevalence and risk factors of peripheral arterial obstructive disease in Taiwanese type 2 diabetic patients.** *Angiology* 54: 331-338.
193. Li J, Luo Y, Xu Y, Yang J, Zheng L, Hasimu B, Yu J, Hu D. 2007. **Risk factors of peripheral arterial disease and relationship between low ankle - brachial index**

- and mortality from all-cause and cardiovascular disease in Chinese patients with type 2 diabetes. *Circ J* 71: 377-381.
194. Tseng CH. 2007. **Sex difference in the distribution of atherosclerotic risk factors and their association with peripheral arterial disease in Taiwanese type 2 diabetic patients.** *Circ J* 71: 1131-1136.
195. Adler AI, Stevens R J, Neil A, Stratton I M, Boulton A J, Holman R R. 2002. **UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 25: 894-899.
196. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker P M. 2001. **Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study.** *JAMA* 286: 64-70.
197. Blum A, Shamburek R. 2008. **The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis.** *Atherosclerosis* [Epub ahead of print].
198. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyooka T, Kato T. 2003. **Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development.** *Circ Res* 93: 948-956.
199. Friese RS, Barber R, McBride D, Bender J, Gentilello L M. 2008. **Could Beta blockade improve outcome after injury by modulating inflammatory profiles?** *J Trauma* 64: 1061-1068.
200. Sironi L, Nobili E, Gianella A, Gelosa P, Tremoli E. 2005. **Anti-inflammatory properties of drugs acting on the renin-angiotensin system.** *Drugs Today (Barc)* 41: 609-622.
201. Namazi MR. 2004. **Cetirizine and allopurinol as novel weapons against cellular autoimmune disorders.** *Int Immunopharmacol* 4: 349-353.
202. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses J A, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath M Y. 2007. **Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 356: 1517-1526.
203. Goren I, Muller E, Pfeilschifter J, Frank S. 2006. **Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha.** *Am J Pathol* 168: 765-777.

6. Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation end products
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BMI	body mass index
BSA	bovines Serumalbumin
CRP	C-reaktives Protein
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DM-Typ	Diabetes mellitus Typ
EDC	Dimethylaminopropyl-Ethyl-Carbodiimide Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
FCS	fötale Kälberserum
HbA1c	glykiertes Hämoglobin, Subfraktion A1c
HDL	high-density lipoprotein
HPE	high performance ELISA-buffer
IFG	impaired fasting glucose, erhöhte Nüchtern glukose
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	interferon- γ -inducible protein 10
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
kDa	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low-density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MIA	multiplex immunoassay
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MMP-8	Matrix-Metalloproteinase 8
NF κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
paVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
rpm	rotations per minute
SOCS-3	suppressor of cytokine signalling-3
T1D	Typ 1 Diabetiker
T2D	Typ 2 Diabetiker
TGF	transforming growth factor
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TMB	Tetramethylbenzidin
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaureat
WHO	World Health Organisation

7. Danksagungen

Mein größter Dank gilt Frau Dr. med. Bettina Rose, ohne die ich diese Arbeit nicht in der erreichten Qualität und Zeit hätte fertigstellen können. Sie ist eine Wissenschaftlerin durch und durch, und ich hoffe, dass etwas davon in den letzten 3 Jahren auf mich hat abfärben können. Einen Effekt kann ich jetzt bereits feststellen: Meine Begeisterung für die Wissenschaft ist in den letzten Monaten des "Zusammenschreibens" enorm gewachsen.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Stephan Martin für die Initiierung der Studie und für die Überlassung des Themas bedanken.

Herrn Dr. phil. nat. Christian Herder danke ich für alle "stattgehabten" Korrekturen, Ideen und Anregungen sowie für rezidivierend aufmunternde Worte.

Frau Ulrike Poschen gebührt mein Dank für die Einführung in die Laborarbeit allgemein und die ELISA-Technik im speziellen. Ebenso war sie es, welche sich noch vor meiner Zeit mit großem Einsatz um die Aufarbeitung, Lagerung und Dokumentation der Fußproben gekümmert hat.

Frau Gabriele Gornitzka danke ich für die Einarbeitung in die Luminex-Technik sowie für die vielen angeregten und anregenden Diskussionen unter der Linde, die mir in Zukunft sicher fehlen werden.

Den Ärzten und Pflegepersonal auf den beiden Stationen 3 und 4 des DDZ sei ebenfalls wie den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Herder, Burkhardt und Schloot für eine gute und entspannte Arbeitsatmosphäre gedankt.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Koenig und Frau Gerlinde Trischler aus dem Universitätsklinikum Ulm für die Überlassung der CRP- und Fibrinogen-Daten.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Freund und Kollegen Michel Kämper bedanken, der dafür verantwortlich ist, dass ich hier im DDZ überhaupt angefangen habe.

Natürlich gilt mein Dank auch meinen Freunden, meinen Großeltern und meinen Eltern, die mir die Voraussetzungen geschaffen haben zu studieren, ebenso wie meiner Schwester Sarah Weigelt und meinem Schwager Oliver Döhrmann für unzählige Zoobesuche in schwierigen Zeiten. Ich habe etwas gebraucht, um zu verstehen, dass Familienmitglieder Freunde sind, mit denen man auch noch verwandt ist.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Christian Michael Weigelt
Geburtsdatum und -ort: 20.04.1981 in Solingen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Pastor-Löh-Str. 36a, 40764 Langenfeld

Schulbildung / Hochschulausbildung

1987 – 1990 St. Martinus Grundschule, Langenfeld
1990 – 1991 Grundschule/Gymnasium “Colegio Alemán Alexander von Humboldt”, Caracas, Venezuela
1991 – 1997 Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld
1997 – 2000 Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen
2000 Abitur, Notendurchschnitt 2,2
2000 – 2001 Zivildienst am St. Martinus Krankenhaus, Langenfeld
2001 – 2003 Vorklinischer Teil des Medizinstudiums an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Physikum, Note „Gut“ (1,66)
2003 – 2007 Klinischer Teil des Medizinstudiums an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
2007 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Wahlfach Neurologie sowie Innere Medizin
2007 – 2008 Praktisches Jahr (Tertial Chirurgie) am Hospital de Clinicas, Universidad de Buenos Aires, Argentinien
06.05.2008 Ärztliche Prüfung, Note „Sehr gut“ (1,5)
seit 11/2008 Assistenzarzt / wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie (Direktor Prof. Dr. med. R. Haas) am Universitätsklinikum Düsseldorf

9. Zusammenfassung

Das diabetische Fußsyndrom – erhöhte Immunparameterkonzentrationen als ein möglicher Erklärungsversuch der chronischen Wundheilungsstörung?

Christian Weigelt

Es ist gut dokumentiert, dass beim Typ 2 Diabetes ätiopathogenetisch immunologische Prozesse eine Rolle spielen. Das diabetische Fußsyndrom bleibt bei sicherer Identifikation klinischer Risikofaktoren pathomechanistisch weitgehend unverstanden. Bezüglich der zugrunde liegenden Wundheilungsstörung ist das Immunsystem in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Fokus gerückt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 170 Patienten mit diabetischem Fußsyndrom (DFS) und 140 diabetische Kontrollen ohne DFS rekrutiert. Nach Erhebung anamnestischer und klinischer Daten wurden neben einem Routinelabor die systemische Konzentrationen verschiedener Immunmediatoren, darunter die der Akut-Phase-Proteine CRP und Fibrinogen, der Zytokine IL-6, MIF und IL-18 sowie der Chemokine IL-8, MIP-1 α , MCP-1, IP-10 und RANTES mittels ELISA bzw. Multiplex-Immunoassay bestimmt. In der Patientengruppe wurde zusätzlich der Verlauf der Immunparameter durch erneute Bestimmung nach 7 und 14 Tagen nach Aufnahme dokumentiert.

Die Patientengruppe zeigte im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Konzentrationen von CRP, Fibrinogen, IL-6, MIF, MIP-1 α und IP-10, welche im Verlauf teilweise absanken, jedoch auch noch zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme im Vergleich zu den diabetischen Kontrollen weiterhin signifikant erhöht waren. RANTES war bei den Patienten signifikant erniedrigt. In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass eine hochsignifikante Assoziation zwischen subklinischer, systemischer Inflammation und dem diabetischen Fußsyndrom besteht. Als wichtigster Parameter, der mit den Immunmediatorkonzentrationen assoziiert ist, konnte der klinische Schweregrad des diabetischen Fußsyndroms (anhand des Wagner-Stadiums) identifiziert werden. Eine gleichzeitig bestehende Infektion beeinflusste die systemische Inflammation nicht. Hier zeigen sich womöglich neue Therapiemöglichkeiten. Es ist denkbar, dass sich durch selektive Immunmodulation – sei es durch Steigerung oder Suppression – die Wundheilung diabetischer Patienten verbessern läßt.