

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Diätetische Interventionsstudie zur Untersuchung des Effektes von
Flavanolen auf Endothelfunktion und Intima-Media-Hyperplasie nach
Endothelverletzung bei transradialer Herzkatheteruntersuchung

Dissertation

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

vorgelegt von
Miriam Schillings

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christian Heiß

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zitierfähiges Abstract:

M. Grone¹, M. Ophoff¹, C. Heiss², M. Kelm¹, R. Sansone¹

¹ Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, ² University of Surrey, Faculty of Health and Medical Sciences - London - United Kingdom

Periinterventional cocoa flavanol supplementation prevents functional and structural damage to the arterial wall after transradial catheter intervention
European Heart Journal, Volume 40, Issue Supplement_1, October 2019, ehz745.0442

Manuskript in Vorbereitung

I. Zusammenfassung deutsch

Hintergrund: Im klinischen Alltag wird der transradiale Zugangsweg für die Koronarangiographie bevorzugt, da er verglichen mit dem transfemorale Zugangsweg mit weniger vaskulären Komplikationen wie Blutungen oder Bildung eines *Aneurysma spurium* assoziiert ist, eine frühere Mobilisation nach Untersuchung ermöglicht und mit einer geringeren Gesamtmortalität verbunden ist. Es gibt zunehmende Evidenz dafür, dass endotheliale Schäden zu intimaler Hyperplasie und negativem vaskulärem *Remodeling* führen, die letztlich in einem totalen Gefäßverschluss münden können.

Ziel: Ziel dieser Arbeit war, die Effekte einer periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung auf (a) die frühe Gefäßantwort und (b) langfristige strukturelle Veränderungen wie Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung der *A. radialis* durch die transradiale Herzkatheteruntersuchung (trHKU) zu untersuchen.

Methoden: Bei 36 Patienten (18 Flavanol-Supplementierungen, 18 Placebo-Kontrollen), die eine transradiale HKU erhielten, wurden radiale flussvermittelte Vasodilatation (FMD) Intima-Media-Dicke (IMT), innerer und äußerer Arterienradius auf Zugangsseite sowie an kontralateraler *A. radialis* bestimmt. Die Messungen erfolgten zu vier Zeitpunkten – als Ausgangswert eine Woche vor HKU, nach einwöchiger Diät mit 820 mg Kakaoflavanolen pro Tag, unmittelbar nach HKU sowie sechs Monate nach HKU. Als Surrogat für endotheliale Funktion, Integrität und Aktivierung wurden gleichzeitig Spiegel zirkulierender endothelialer Mikropartikel (EMP) der Subpopulationen CD31⁺/41⁻, CD62e⁺ und CD144⁺ analysiert.

Ergebnisse: Nach einwöchiger Flavanol-Supplementierung, nicht nach Placebo-Gabe, stieg die FMD (+2,0 %, 95% KI [1,2; 2,7] vs. 0,0 %, 95% KI [-0,8; 0,7]) signifikant an. Die FMD der *A. radialis* auf Zugangsseite fiel direkt nach trHKU in beiden Gruppen signifikant, in der Flavanol-Gruppe trendweise weniger, ab. Während sich die FMD in der Flavanol-Gruppe nach sechs Monaten vollständig erholte, blieb sie in der Placebo-Gruppe signifikant verschlechtert (-0,7 %, 95% KI [-1,1; -0,3]). Sechs Monate nach trHKU kam es in der Placebo-Gruppe zu einer signifikanten intimalen Hyperplasie der *A. radialis* (+0,074 mm, 95% KI [0,061; 0,088]). In der Flavanol-Gruppe war keine signifikante Zunahme der IMT zu verzeichnen (+0,013 mm, 95% KI [-0,001; 0,026]). In der Placebo-Gruppe zeigte sich unmittelbar nach trHKU eine signifikante Zunahme von äußerem (+0,22 mm, 95% KI [0,07; 0,37]) und innerem (+0,22 mm, 95% KI [-0,07; 0,36]) Durchmesser. Flavanol-Supplementierung senkte die Plasmaspiegel der untersuchten EMP-Subpopulationen CD31⁺/41⁺, CD144⁺ und CD62e⁺. In der Placebo-Gruppe war zwei Stunden nach HKU ein signifikanter Anstieg aller untersuchten EMP-Subpopulationen zu verzeichnen.

Zusammenfassung: Die transradiale HKU beeinträchtigt die Endothelfunktion der Radialarterie kurz- und langfristig und induziert langfristig eine intimale Hyperplasie. Periinterventionelle Flavanol-Supplementierung verbessert kurzfristig die Endothelfunktion und mindert die postinterventionelle Reduktion der Endothelfunktion. Langfristig verhindert sie eine dauerhafte Abnahme der Endothelfunktion sowie eine Intima-Media-Hyperplasie.

II. Zusammenfassung englisch

Background: In routine coronary angiography the transradial approach is commonly preferred over the femoral as it is associated with fewer vascular complications like bleeding or aneurysm formation ensuring early ambulation and, most importantly, decreased all-cause mortality after coronary procedures. However, there is growing evidence that damage to the radial artery endothelium elicits intimal hyperplasia and negative vascular remodeling, which can ultimately lead to vessel obstruction or total occlusion.

Objective: In this study we sought to investigate the effects of peri-interventional dietary flavanol supplementation on (a) early endothelial functional recovery and (b) late structural changes, i.e. intimal hyperplasia, after mechanical vascular wall injury in the patient's radial artery during transradial coronary angiography (TCA).

Methods: Radial artery flow-mediated vasodilation (FMD), intima-media thickness (IMT) and luminal and external arterial diameter at the site of intervention and at the contralateral control artery were measured in 36 male patients (18 flavanol group, 18 placebo control) undergoing TCA. Measurement took place at four timepoints at baseline one week before TCA, after one week of 820 mg flavanol supplementation per day, directly after TCA and six months after TCA. Circulating levels of endothelial microparticle (EMP) subpopulations CD31⁺/41⁻, CD62e⁺ and CD144⁺ were analyzed simultaneously as a surrogate for endothelial functional integrity and activation.

Results: One week of flavanol supplementation, not placebo, significantly increased FMD (+2.0%, 95% CI [1.2, 2.7] vs. 0.0%, 95% CI [-0.8, 0.7]). FMD significantly decreased in the intervention artery directly after TCA, which was partly mitigated by flavanol supplementation (Flavanol -3.3%, 95% CI [-4.6, -2.0] vs. Placebo -4.2%, 95% CI [-5.5, -2.9]). FMD remained impaired in the placebo group (-0.7%, 95% CI [-1.1, -0.3]) after six months whereas FMD fully recovered in the flavanol group. TCA induced significant intimal hyperplasia in the radial artery (+0.074 mm, 95% CI [0.061, 0.088]) in the placebo but not in the flavanol group (+0.013 mm, 95% CI [-0.001, 0.026]). In the placebo group outer (0.22 mm, 95% CI [0.07, 0.37]) and inner (0.22 mm, 95% CI [-0.07, 0.36]) diameter increased immediately after TCA. Flavanol supplementation lowered the levels of circulating CD31⁺/41⁺, CD144⁺ and CD62e⁺ EMPs. TCA induced an increase in circulating levels of all measured EMP subpopulations in the placebo group.

Conclusions: TCA leads to a short- and long-term impairment of endothelial function and induces intimal hyperplasia. Periinterventional flavanol supplementation blunts the acute decreases in endothelial function and inhibits long-term intimal hyperplasia after mechanical vascular wall injury.

III. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
AK	Antikörper
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CAC	zirkulierende angiogenetische Zellen
EDH	<i>endothelium-derived hyperpolarizing</i>
EEM	externe elastische Membran
EKG	Elektrokardiogramm
ELAM-1	<i>endothelial-leukocyte adhesion molecule-1</i>
EMP	endotheliale Mikropartikel
eNOS	endotheliale NO-Synthase
E-Selektin	Endothel-Selektin
d	Diameter
FACS	Durchflusszytometrie
FMD	flussmedierte Diameteränderung (<i>flow-mediated dilatation</i>)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GP	Glykoprotein
h	Stunde
IMT	Intima-Media-Dicke
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Monat
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
<i>n</i>	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoff Monoxid
n. s.	nicht signifikant
NYHA	<i>New York Heart Association</i>

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCI	Perkutane Koronarintervention
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PE	Phycoerythrin
PFP	Thrombozytenfreies Plasma
PMP	Plättchen-generierte Mikropartikel
ROI	<i>region of interest</i>
s	Sekunde
s.	siehe
<i>SD</i>	Standardabweichung
<i>SEM</i>	Standardfehler
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
trHKU	transradialer Herzkatheteruntersuchung
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial Cadherin</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus

IV. Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG DEUTSCH.....	I
II	ZUSAMMENFASSUNG ENGLISCH.....	II
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
IV	INHALTSVERZEICHNIS.....	V
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Bedeutung des transradialen Zugangsweges für die Koronarangiographie	1
1.2	Arterielle Remodellierungsprozesse	3
1.2.1	<i>Response-to-injury</i> : Intimahyperplasie und Atherogenese	3
1.2.2	Arteriell <i>Remodeling</i> nach Glagov.....	5
1.3	Endotheliale Dysfunktion	7
1.3.1	Physiologische Endothelfunktionen	7
1.3.2	FMD als Maß für Endothelfunktion	9
1.3.3	Pathophysiologie und klinische Bedeutung der endothelialen Dysfunktion	10
1.4	Mikropartikel als Marker endothelialer Integrität	12
1.5	Einfluss von Kakaoflavanolen auf das kardiovaskuläre System	16
1.6	Ziele dieser Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Studienprotokoll	20
2.2	Studienkollektiv	23
2.3	Angiologische Untersuchungen	25
2.3.1	Messbedingungen	25
2.3.2	Bestimmung des Blutdrucks und der Herzfrequenz	25
2.3.3	Bestimmung der Gefäßfunktion mittels FMD.....	25
2.4	Auswertung der Ultraschalluntersuchungen.....	28
2.4.1	Ermittlung der FMD	28
2.4.2	Ermittlung der IMT	29
2.4.3	Ermittlung des inneren und äußeren Diameters	30
2.5	Blutentnahme und Gewinnung von plättchenfreiem Plasma	31
2.6	Durchflusszytometrie (FACS)	32
2.6.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Mikropartikel-Subpopulation.....	32
2.6.2	Auswertung der Durchflusszytometrie.....	33
2.7	Klinisch-chemische Laborparameter	35
2.8	Biometrie und Anamnese.....	35

2.9	Mathematisch-statistische Verfahren	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Patientencharakteristika	36
3.2	Ergebnisübersicht der vier Endpunkte	38
3.3	Einfluss der Kakaoflavanole auf die Endothelfunktion (FMD) vor und nach transradialer Herzkatheteruntersuchung	39
3.4	Einfluss von Kakaoflavanolen auf die Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung	42
3.5	Einfluss von Kakaoflavanolen auf inneren und äußeren Gefäßdiameter:	43
3.6	Einfluss der Kakaoflavanole auf den Spiegel zirkulierender EMP	45
4	DISKUSSION	49
4.1	Einordnung der eigenen Methoden in die Literatur	50
4.2	Einfluss des transradialen Zugangsweges auf Integrität, Struktur und Funktionalität des Endothels	52
4.3	Einfluss der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung auf Integrität, Struktur und Funktionalität des Endothels	55
4.3.1	Kakaoflavanole verbessern kurzfristig die Endothelfunktion und verhindern eine langfristige Verschlechterung der Endothelfunktion nach mechanischer Endothelverletzung	55
4.3.2	Kakaoflavanole verhindern langfristig Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung.....	57
4.3.3	Einfluss von Kakaoflavanolen auf die Änderung von inneren und äußeren Diameter sowie langfristiges <i>Remodeling</i> nicht belegbar.....	59
4.4	Einfluss der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung auf endotheliale Mikropartikel als Surrogatparameter und Modifikator der Endothelfunktion nach mechanischer Verletzung	60
4.5	Limitationen der Studie	63
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	64
4.7	Graphical Abstract	65
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	66
6	ANHANG	74
6.1	Abbildungsverzeichnis	74
6.2	Tabellenverzeichnis	74
	DANKSAGUNG	75

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen seit Jahren die häufigste Todesursache in Industrienationen dar. Im Jahr 2019 waren laut statistischem Bundesamt mit rund 35 % wie in den Vorjahren deutschlandweit die meisten Todesfälle auf diese Ursache zurückzuführen. Rund 13 % dieser kardiovaskulär bedingten Sterbefälle wurden von akuten Myokardinfarkten verursacht sowie weitere 22 % durch eine chronische ischämische Kardiomyopathie.

Aufgrund der hohen Lebenszeitprävalenz und Mortalität der koronaren Herzerkrankung (KHK) nimmt die Koronarangiographie in der Patientenversorgung einen hohen Stellenwert ein. Sie ist sowohl für Diagnostik als auch für Therapie unverzichtbar.

1.1 Bedeutung des transradialen Zugangsweges für die Koronarangiographie

Der transradiale Zugangsweg hat für die Koronarangiographie seit seiner Erstbeschreibung durch Campeau (1) im Jahr 1989 zunehmend an Bedeutung gewonnen und wird seit 2018 von den *ESC/EACTS European revascularization guidelines* als Standardzugangsweg für diagnostische Koronarangiographien und perkutane Koronarinterventionen (PCI) empfohlen, sofern keine prozeduralen oder patientenbezogenen Umstände dagegen sprechen (2).

Ein wesentlicher Vorteil des transradialen gegenüber dem transfemorale Weg liegt im oberflächlichen Verlauf der *A. radialis* am distalen Unterarm, wodurch Punktion und Kompression einfach durchzuführen sind und Blutungen schnell bemerkt werden können. Hieraus resultieren, bei vergleichbarer Erfolgsrate der Interventionen, erheblich reduzierte Blutungskomplikationen (3–5) und eine geringere Gesamt-Mortalität bei STEMI-Patienten (5) und Patienten im kardiogenen Schock (6). Außerdem bedeutet der transradiale Zugangsweg einen deutlichen

Komfortzugewinn für den Patienten und ist durch Wegfallen der Bettruhe mit kürzerem Krankenhausaufenthalt und geringeren Kosten verbunden (7). Auch das Risiko periinterventioneller arterio-venöser Fistelbildung oder Nervenschädigungen ist gegenüber dem transfemoralem Zugang niedriger, sodass sich sowohl für ambulante Diagnostik als auch für komplexe Interventionen Vorteile ergeben (7).

Trotz der überwiegenden Vorteile kann der Zugang über die Radialarterie nicht uneingeschränkt empfohlen werden. Im Falle nicht ausreichend ausgebildeter Kollateralen zwischen dem radialen und ulnaren Stromgebiet sind Gefäßverschlüsse mit konsekutiver Minderperfusion der Hand möglich. Die Inzidenz radialer Okklusionen variiert in der einschlägigen Literatur sehr stark. Die *ARTEMIS* – Studie hat im Rahmen einer Metaanalyse von 112 Studien eine Gesamt-Okklusionsrate von 5,2 % ermittelt, wobei eine *low-dose* Heparin-gabe (7,2 %) bei HKU mit höheren Verschlussraten assoziiert ist als eine *high-dose* Heparin-gabe (4,3 %) (8). Andere vaskuläre Komplikationen wie die Bildung eines Pseudoaneurysmas oder einer arterio-venösen Fistel kommen deutlich seltener vor (9). Eine weitere häufige Komplikation, die im unmittelbaren Zusammenhang mit der transradialen Technik steht, sind Gefäßspasmen. In den meisten Fällen können sie medikamentös, beispielsweise durch die Gabe von Nitroglycerin oder Verapamil, durchbrochen werden; andernfalls muss ein alternativer Zugangsweg gewählt werden. (7)

Eine wichtige relative Kontraindikation für den transradialen Zugangsweg besteht bei Patienten mit chronischem Nierenversagen, bei denen die Anlage eines arterio-venösen Shunts zur Dialyse notwendig werden könnte. Die durch das transradiale Kathetern gesetzten Gefäßverletzungen gehen mit langfristigen Veränderungen der Wandstruktur einher, die postinterventionell als Zunahme der IMT gemessen werden können (10–14). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem solchen Shunt die Intima-Media-Dicke (IMT) positiv mit frühem Shuntversagen und gesteigerter kardiovaskulärer Mortalität korreliert (15).

Die Wahl des transradialen Zugangswegs hat auch Bedeutung für die koronare Bypass-Chirurgie. Nach den *ESC/EACTS European revascularization guidelines*

von 2018 ist die Radialisarterie einem venösen Bypass überlegen. Ihre Verwendung wird empfohlen, wenn bei zwei benötigten Bypässen nicht beide *Aa. thoracicae internae* verwendet werden können, wenn drei arterielle Bypässe benötigt werden oder ein hohes Risiko für sternale Wundheilungsstörungen vorliegt. Nach stattgehabter transradialer Koronarangiographie wird jedoch wegen möglicher persistierender Endothelschädigung und -dysfunktion von einer Verwendung der *A. radialis* als Bypass abgeraten. (2,16)

Auch aus Sicht des Untersuchenden ergeben sich Limitationen. Interventionen über den transradialen Zugang gelten als technisch anspruchsvoller und erfordern mehr Praxiserfahrung des Sonders. (17). Auf Grund dieser technischen Ansprüche ist bei transradialen Untersuchungen und Interventionen im Vergleich zu transfemorale durchgeführten Untersuchungen meist eine höhere Strahlenbelastung für Untersucher und Patient messbar (18).

1.2 Arterielle Remodellierungsprozesse

Wie in 1.1 beschrieben, geht die transradiale Herzkatheteruntersuchung (trHKU) mit einer Zunahme der radialen IMT einher und kann in einer vollständigen Okklusion der kanülierten *A. radialis* münden. Diese Hyperplasie von Intima und Media kann anhand nachfolgend beleuchteter physiologischer Erklärungsmodelle als Reaktion auf die Gefäßwandverletzung interpretiert werden.

1.2.1 *Response-to-injury*: Intimahyperplasie und Atherogenese

Dem 1977 von Ross *et al.* postulierten Konzept der „*response-to-injury*“ entsprechend führen arterielle Endothelverletzungen zu intimaler Hyperplasie. Auslöser dieser Endothelverletzungen können etwa chronische Hyperlipoproteinämie, chemische Noxen wie Homozystein, Harnstoff, Entzündungsmediatoren oder mechanische Endothelschädigung sein. Letztere kann beispielsweise durch erhöhte Wandscherspannung oder iatrogen durch intraarterielle Katheter oder Angioplastie bedingt sein. (19)

Die durch die Endothelverletzung provozierte Antwort mündet über verschiedene Schritte schließlich in der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima. Neben ihrer Hyperplasie tragen die glatten Muskelzellen auch durch vermehrte Produktion extrazellulärer Matrix zur Zunahme der Intimadicke bei. (20)

Intima-Media-Hyperplasie kann im Rahmen physiologischer Vorgänge stattfinden, wie zum Beispiel bei perinatalem Schluss des *Ductus arteriosus* oder diffuser IMT-Zunahme im Alter (21).

Im überschießenden Maß wird sie jedoch zum zentralen Mechanismus verschiedener pathologischer Prozesse. So gilt eine sonographisch gemessene Zunahme der IMT in der Karotis als starker Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall (22). Hohe klinische Relevanz kommt der überschießenden Intima-Media-Hyperplasie insbesondere bei Revaskularisationsverfahren zu. Sie wird sowohl nach Angioplastie- und Stentverfahren als auch nach Bypass-chirurgischen Eingriffen beobachtet und kann sich im postinterventionellen Auftreten von (Re-)Stenosen, In-Stent-Stenosen oder Okklusionen manifestieren (23).

Bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques gilt die Intima-Hyperplasie auf mikroskopischer Ebene als früheste strukturelle Änderung der Gefäßwand (24). Sie bildet die erste von fünf Phasen, die vereinfacht wie folgt ablaufen: Endothelverletzungen führen zu endothelialer Dysfunktion und gesteigerter endothelialer Permeabilität. In der initialen Phase kommt es an der Stelle der Läsion zunächst zu einer Verdickung der Intima mit Einlagerung von Lipiden. Infolgedessen wandern Monozyten ein, die sich zu Makrophagen und durch Phagozytose akkumulierter Lipide weiter in sogenannte Schaumzellen differenzieren. Die vor allem von Schaumzellen und eingewanderten glatten Muskelzellen geprägten Typ-II-Läsionen werden auch als *fatty streaks* bezeichnet. Typ-III-Läsionen unterscheiden sich von Typ-II-Läsionen durch extrazellulär auftretende Lipidtropfen. Bei Typ-IV-Läsionen dominiert zunehmend der so entstandene, von einer dünnen fibrösen Kappe bedeckte Lipidkern, das so genannte Atherom. Die Umwandlung in

ein Fibroatherom durch Zunahme von glatten Muskelzellen und Kollagenfasern charakterisiert Phase V. (25)

1.2.2 Arteriell *Remodeling* nach Glagov

Die mit der Bildung atherosklerotischer Plaques einhergehenden arteriellen Wandveränderungen wurden erstmals 1987 von Glagov *et al.* in einer Autopsie-Studie detailliert beschrieben (26). Grundannahme ist, dass Intima, Media und externe elastische Membran (EEM) nicht fix in ihrer Größe sind und Plaques dadurch nicht zwangsläufig zu einer Stenose des Gefäßes führen.

Es wird zwischen zwei möglichen Remodellierungsprozessen unterschieden: Beim positiven *Remodeling* kommt es im Zuge der Entwicklung von Atherosklerose im betroffenen Gefäßabschnitt zu einem kompensatorischen Gefäßwachstum mit Umfangsvermehrung. Dadurch bleibt das Gefäßlumen trotz zunehmender Plaques-Größe konstant. Beim negativem *Remodeling* führt der bindegewebliche Umbau zur Abnahme des Außendurchmessers und Stenosierung des Gefäßlumens im Bereich der Plaques.

Nachfolgende *in vivo* Studien konnten diese Beobachtungen mittels intravaskulärem Ultraschall bestätigen (27,28). Es wird vermutet, dass es bei frühen, instabilen Plaques eher zu positivem und bei stabilen Plaques eher zu negativem *Remodeling* kommt (29).

Der von Glagov beobachtete Mechanismus, das Gefäßlumen und damit den Blutfluss an atherosklerotischen Läsionen durch positives *Remodeling* konstant zu halten, konnte in späteren Studien auch als adaptive Antwort arterieller Gefäße auf Gefäßverletzung nach Angioplastie nachgewiesen werden (32).

Da arterielles *Remodeling* als dynamische Größenänderung der von der EEM begrenzten Querschnittsfläche (EEM-Fläche) über die Zeit definiert ist, kann über ihre Dynamik in Studien mit Querschnittsdesign nur eine indirekte Aussage getroffen werden (29). Der Remodellierungs-Index setzt die EEM-Fläche an der Läsion in Relation zu der EEM-Fläche der gesunden Referenz bzw. des

vorgeschalteten Gefäßabschnitts. Ein Index > 1 spiegelt positives, ein Index < 1 negatives *Remodeling* wider.

Eine direkte Aussage über arterielles *Remodeling* kann in Longitudinalstudien vorgenommen werden, in dem die beobachtete Größenänderung der EEM-Fläche in Verhältnis zur Änderung der Atheromfläche (EEM-Fläche – Lumenfläche) gesetzt wird. Ein Quotient > 1 wird als positives, überkompensierendes *Remodeling* interpretiert, während ein Quotient von $0 - 1$ ein inkomplettes und ein Quotient < 0 ein negatives, konstringierendes *Remodeling* anzeigt. (30,31)

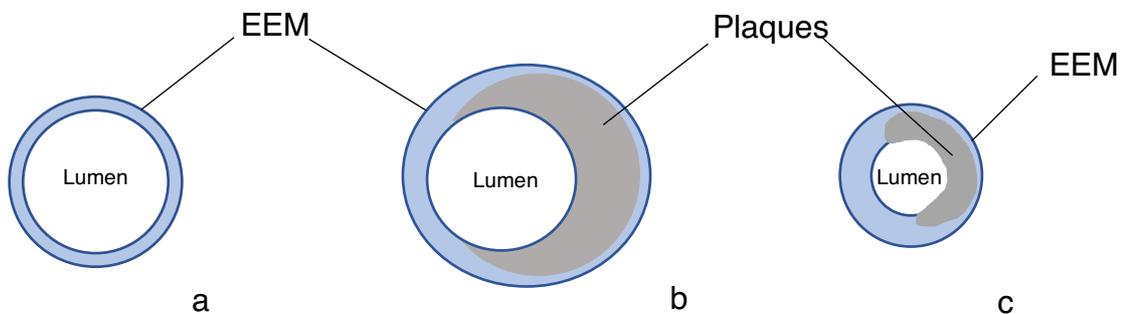


Abb. 1: gesunder Gefäßabschnitt (a), positives (b) und negatives *Remodeling* (c)

Bei positivem *Remodeling* kommt es im Bereich der Plaques zu einem kompensatorischen Gefäßwachstum mit Umfangsvermehrung. Bei negativem *Remodeling* führt bindegeweblicher Umbau zur Abnahme des Außendurchmessers und Stenosierung des Gefäßlumens im Bereich der Plaques. Adaptiert von (29).

1.3 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist maßgeblich für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase verantwortlich. Störungen der physiologischen Endothelfunktion tragen entscheidend zu Entstehung und Progression der Atherosklerose bei (33).

1.3.1 Physiologische Endothelfunktionen

Physiologischerweise besteht das Endothel aus einer einzelnen Zellschicht, die in der Lage ist, akut auf chemische und physikalische Reize mit der Sekretion unterschiedlicher Faktoren zu antworten und so verschiedenste Prozesse zu regulieren. Hierzu zählen die Kontrolle von Zelladhäsion, Gerinnung, Proliferation glatter Muskelzellen und Inflammation der Gefäßwand sowie die Aufrechterhaltung endothelialer Integrität und Permeabilität. (34,35)

Die am besten untersuchte Funktion des Endothels besteht in der Regulation des Gefäßtonus durch balancierte Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen wie Prostaglandinen, *endothelium-derived hyperpolarizing (EDH) factor* und Stickstoff NO oder Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (36).

NO, eine Schlüsselsubstanz in der Aufrechterhaltung vaskulärer Homöostase, wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin unter Verbrauch von NADPH synthetisiert. Anschließend diffundiert NO in die Blutstrombahn sowie in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Dort aktiviert NO die Guanylatzyklase, die über Steigerung der cGMP-Konzentration die Öffnung von Calcium (Ca^{2+})-Kanälen auslöst. Dadurch kommt es zu einer Ca^{2+} -vermittelten Relaxierung der glatten Muskelzellen.

Neben seiner direkten Aufgabe als Vasodilatator beeinflusst NO auch die Freisetzung anderer endothelgenerierter vasoaktiver Substanzen. So kommt es infolge inhibierter NO-Produktion in mittelgroßen Arterien zu NO-unabhängiger EDH – vermittelter Dilatation, die sonst vor allem in kleinen Arterien eine Rolle zu spielen scheint (36).

Des Weiteren wirkt NO endothelprotektiv, in dem es die Thrombozytenaggregation, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Adhäsion und Penetration von Leukozyten und damit prothrombotische und inflammatorische Prozesse inhibiert.

Die physiologische situationsadaptierte NO-Freisetzung wird durch die eNOS sichergestellt. Es handelt sich um ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das die meisten Endothelfunktionen moduliert. Es findet sich vor allem auf dem Endothel großer Arterien. Die Expression nimmt in kleiner werdenden Gefäßen stetig - bis hin zum vollständigen Fehlen in Kapillaren - ab, konnte aber auch auf Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, zirkulierenden angiogenetischen Zellen (CAC) und EMPs nachgewiesen werden. (34)

Ein physiologisch sehr potenter eNOS-Aktivator besteht in der durch laminaren Fluss induzierten Scherspannung (37). Durch dieses endotheliale *mechanosensing* und *-transducing* kann die Organperfusion schnell an die kardiale Auswurfleistung angepasst werden. Bei anhaltend erhöhter Scherspannung wird eNOS von den Endothelzellen vermehrt exprimiert, wodurch scheinbar die Gefäßarchitektur an den vorherrschenden Blutfluss angepasst werden kann (38).

Zusätzlich zur Scherspannung kann die eNOS durch Signalmoleküle wie Bradykinin, Adenosin, dem bei Hypoxie ausgeschütteten *vascular endothelial growth factor* und dem bei Thrombozytenaggregation freigesetzten Serotonin aktiviert werden (39).

Neben der Vermittlung vasodilatativer, antiinflammatorischer und antithrombotischer Prozesse wird der eNOS eine Schlüsselfunktion bei der Gefäßregeneration zugeschrieben. Im Rahmen des Reparaturprozesses nach vaskulärer Schädigung, der essenziell für die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität und Funktionalität und somit auch für die Prävention der Atherogenese ist, werden CAC aus dem Knochenmark mobilisiert (40). Die mobilisierten CAC wandern zu ischämischen Läsionen und Endothelverletzungen und vermitteln dort Angiogenese oder Reparatur endothelialer Defekte, ohne selbst in reife Endothelzellen zu differenzieren (41). Hierbei scheint die eNOS wichtig für die Freisetzung aus dem Knochenmark, die Chemotaxis und die Funktionalität der CAC zu sein, da diese Prozesse NO-vermittelt ablaufen (34). Zwischen der Anzahl und

Funktionalität der CACs sowie der Ausprägung von kardiovaskulären Risikofaktoren wurde in der Literatur eine Assoziation beschrieben (42). Zudem scheint die Anzahl der CACs einen prognostischen Faktor für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und kardiovaskulär bedingten Todesursachen darzustellen (43).

1.3.2 FMD als Maß für Endothelfunktion

Der prognostisch validierte Goldstandard zur nicht-invasiven Quantifizierung der Endothelfunktion größerer arterieller Gefäße wie der *A. brachialis* oder der *A. radialis* ist die Bestimmung der FMD (44–46), (47),(48).

Die durch suprasystolische Stauung iatrogen induzierte Ischämie führt bei Reperfusion zu einer reaktiven Hyperämie mit Flusssteigerung im betroffenen Gefäß. Hierdurch wirken erhöhte laminare Scherkräfte auf das Endothel, die einen Stimulus für die endotheliale NO-Sekretion bilden und konsekutiv mit einer Vasodilatation einhergehen. (49,50)

Als quantifizierbares Maß für die vasomotorische Endothelfunktion wird das Verhältnis von Gefäßdurchmesser in Ruhe zu maximaler postischämischer Durchmesserzunahme gebildet. Neben einer direkten Aussage über die Endothelfunktion kann die FMD auch als Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko herangezogen werden, da die (brachiale) FMD invers mit dem Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse korreliert (51).

Schuler *et al.* etablierten die Messung der FMD zur Bestimmung der Endothelfunktion ebenfalls im Mausmodell (52). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die FMD ein eNOS-abhängiger Prozess ist. Sowohl durch die Gabe von L-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), einem kompetitiven eNOS-Inhibitor, als auch in genetisch veränderten Tieren mit deaktivierter eNOS zeigte sich keine flussvermittelte Vasodilatation mehr.

Eine der wichtigsten Limitationen dieser Methode liegt in der großen Abhängigkeit der Ergebnisse von Messbedingungen (Raumtemperatur, Tageszeit, Position der Manschette, Dauer der Ischämie etc.), Vorbereitung der Patienten (Medikamenteneinnahme, Ernährung, sportliche Aktivität etc.) und Training des

Untersuchers (53). Durch die Etablierung von *standard operating procedures* können diese Fehler jedoch soweit reduziert werden, dass FMD-Messungen auch in multizentrischen Studien reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse liefern (54).

1.3.3 Pathophysiologie und klinische Bedeutung der endothelialen Dysfunktion

Verliert das Endothel im Rahmen eines chronisch inflammatorischen Prozesses seine vasodilatatorischen und antithrombotischen Eigenschaften zugunsten einer gesteigerten Produktion vasokonstriktorischer und prothrombotischer Faktoren, wird dies als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Bei Anwesenheit verschiedener proinflammatorischer Stimuli exprimiert das Endothel außerdem auf Leukozyten wirkende Chemokine, Adhäsionsmoleküle und inflammatorische Zytokine. (55)

Die Stimuli für die Initiierung einer solchen chronischen Inflammation sind divers. Allgemein lässt sich nach heutigem Kenntnisstand sagen, dass alle Stimuli, die zu einer akuten oder chronischen Veränderung der NO-Produktion führen, endotheliale Dysfunktion begünstigen. In ersten pathophysiologischen Modellen nahm man - in Anlehnung an das zuvor beschriebene „*response-to-injury*“ Konzept, bei dem eine Intima-Verletzung am Anfang der Atherogenese steht - einen anatomischen Integritätsverlust der Intima als Auslöser an. (56)

Nachfolgende Studien konnten beweisen, dass katheterassoziierte Endothelverletzungen kurzfristig mit einer Reduktion der FMD als Maß für die Endothelfunktion und langfristig mit einer Zunahme der IMT als Korrelat für strukturelle Wandveränderungen einhergehen (10,57). Zusätzliche Endothelschädigung (und Beeinträchtigung der eNOS-Funktion) durch Nikotinkonsum verzögern die Wiederherstellung der Endothelfunktion und beeinträchtigen die Endothelreparatur nach Katheter (58).

Da im Tiermodell bei diät-induzierten frühen atherosklerotischen Läsionen (*fatty streaks*) keine Endothelläsion nachgewiesen werden konnte, wurde das Modell dahingehend erweitert, dass chronische Inflammation und endotheliale Dysfunktion nicht zwingend durch Endothelschaden, sondern auch durch diverse

pathophysiologische Stimuli ausgelöst werden können (56). Dazu zählen vor allem die Anwesenheit klassischer und neuer kardiovaskulärer Risikofaktoren, genetische Prädisposition und lokale turbulente Strömung (34). Dieser Ansatz wird von der Beobachtung gestützt, dass es bei Anwesenheit klassischer und neuer kardiovaskulärer Risikofaktoren zu einer Reduktion und umgekehrt bei Interventionen zur Risikoreduktion zu einem Wiederanstieg der brachialen FMD und somit der Endothelfunktion kommt (55). Auch *in vitro* kann die Apoptose von Endothelzellen durch proatherogene Stimuli induziert werden, während Statine und Vitamin C die Apoptose vermindern können (40).

In Folge von gestörter Endothelfunktion und verminderter NO-Bioverfügbarkeit kommt es zu strukturellen Veränderungen mit Kollagenanreicherung in den großen Gefäßen. Dies führt zu einer reduzierten Dämpfung der Pulswellengeschwindigkeit mit konsekutiv erhöhtem mechanischem Stress der Widerstandsgefäße. (59)

In der Folge kommt es zu weiteren strukturellen Veränderungen der Gefäßwand mit weiterer Anreicherung von extrazellulärem Kollagen und einer Zunahme der glatten Muskelzellen. (60) Heinen *et al.* konnten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen einer lokalen Verschlechterung der Endothelfunktion und einer gefäßstrukturellen Veränderung im Sinne einer Intima-Media-Hyperplasie aufzeigen (61).

Endotheliale Dysfunktion ist in hohem Maße klinisch relevant. Im engeren Sinne ist sie definiert als Abnahme der Dilatationsfähigkeit durch reduzierte Produktion vasodilatatorischer Substanzen (31). Dieser Prozess ist durch FMD-Messungen quantifizierbar (s.o.). Im weitesten Sinne bezeichnet endotheliale Dysfunktion die Konversion in einen proatherogenen Phänotypen.

Verminderte Endothelfunktion gilt als die am frühesten detektierbare Veränderung bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques und geht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einher. Bei Krankheitsbildern wie stabiler und instabiler *Angina pectoris*, Myokardinfarkt und Schlaganfall spielt die verminderte endotheliale Regulation von Gefäßtonus, Gerinnung und Gefäßwandstruktur eine entscheidende pathophysiologische Rolle. (44,45)

Zusammenfassend kann die endotheliale (Dys-)Funktion also als Barometer für kardiovaskuläre Gesundheit betrachtet werden. (62)

1.4 Mikropartikel als Marker endothelialer Integrität

Mikropartikel (MP) sind 0,1 – 1 μm große Zellmembranabschnürungen endothelialer oder im peripheren Blut zirkulierender Zellen. Daher exprimieren sie auf der Oberfläche Antigene ihrer Ursprungszellen. (63)

Sowohl Zellaktivierung als auch Apoptose und Zelltod bewirken über eine Erhöhung des zytosolischen Calciumgehalts die Freisetzung von Mikropartikeln. Die für die Zellaktivierung erforderlichen Stimuli umfassen sowohl Bindung von Agonisten als auch chemischen und physikalischen Stress und können sich je nach Ursprungszelle unterscheiden. (64)

Mikropartikel zirkulieren physiologischerweise im Blut Gesunder und steigen bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich stark an. Da sich neben ihrer Zahl auch ihr Phänotyp je nach pathologischem Prozess unterscheidet, können sie als Marker für verschiedene Erkrankungen herangezogen werden (65).

Zirkulierende Mikropartikel werden jedoch nicht nur als Produkt bestimmter Pathologien angesehen. Es wird angenommen, dass sie als Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation verschiedene physiologische und pathologische Prozesse wie Gerinnung, Inflammation oder Angiogenese mitregulieren (66).

Endotheliale Mikropartikel (EMP) können als Marker für Endothelverletzungen und beeinträchtigte Endothelfunktion gesehen werden, die im Zuge von Zellaktivierung und Apoptose freigesetzt werden (65). Daher sind bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit endothelialer Schädigung einhergehen, höhere EMP-Konzentrationen im Plasma messbar. Gesteigerte Plasmaspiegel werden frühzeitig bei Atherosklerose (67,68), Hypertonie (69) sowie bei akuter Endothelverletzung durch beispielsweise Passivrauchen (70) oder katheterinduzierter mechanischer Endothelschädigung (69) beobachtet. In allen

genannten Studien korrelierten die EMP-Plasmaspiegel negativ mit der gemessenen Endothelfunktion. Ihre inverse Korrelation zu erniedrigter Wandscherspannung (69,71) lässt sich dadurch erklären, dass turbulente Strömung zu vermehrter Apoptose endothelialer Zellen führt (72).

Zudem können EMP als prognostischer Biomarker für die Risikostratifizierung bei KHK-Patienten herangezogen werden, da gesteigerte EMP-Level einen unabhängigen Risikofaktor für schlechtes Outcome bei KHK-Patienten darstellen (73,74). Umgekehrt triggert das Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren die Freisetzung von EMP (68).

EMP sind nicht nur Marker für gestörte Endothelfunktion und atherosklerotische Prozesse; sie nehmen aktiv Einfluss auf diese Pathologien. Als komplexe vesikuläre Strukturen tragen sie auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle und verfügen in ihrem Inneren über verschiedene Zytokine, Enzyme, Signalproteine und mRNA.

Über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Hemmung der eNOS, mindern EMP die Produktion und/oder Bioverfügbarkeit von NO (66,68). Dies hat wiederum eine eingeschränkte Dilatationsfähigkeit des Gefäßes zur Folge. Außerdem tragen EMP durch die Förderung eines prothrombotischen und proinflammatorischen Zustandes über verschiedene Mechanismen zu der Ausprägung eines proatherogenen Phänotyps der Endothelzellen bei. Einen möglichen Beitrag hierzu leistet die zuvor bereits erwähnte verminderte Verfügbarkeit von NO durch EMP, das physiologischer Weise der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten sowie der Proliferation von Zellen entgegenwirkt. (66) Zudem konnte gezeigt werden, dass EMP die Reifung plasmazytoider dendritischer Zellen und damit die Sekretion der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8 fördert (75).

Wie zuvor erwähnt, lässt sich anhand von Oberflächenmarkern, die auch auf den Ursprungszellen zu finden sind, auf die Herkunft der Mikropartikel schließen (63). Ferner kann anhand konstitutiver und induzierbarer Oberflächenmarker die Genese endothelialer Mikropartikel durch Apoptose oder Aktivierung unterschieden werden (76).

In der vorliegenden Arbeit werden zur Identifizierung und Charakterisierung von EMP die folgenden Antigene untersucht:

CD31, auch als *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)* oder Glykoprotein IIa (GPIIa) bezeichnet, ist ein 130 kDa großes Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Exprimiert wird es sowohl auf der Oberfläche von Thrombozyten und Leukozyten als auch auf Endothelzellverbindungen. PECAM-1 ist an vielen verschiedenen biologischen Prozessen wie Leukozytentransmigration, Zellmigration, Angiogenese und Zelladhäsion beteiligt. (77)

CD31 zählt zu den konstitutiven Oberflächenmarkern des Endothels und wird bei Apoptose vermehrt exprimiert (63,77). Durch eine Zweifachfärbung mit CD31 und CD41 (s.u.) können die CD31⁺/CD41⁻ endothelialen MPs (EMP) von den CD31⁺/CD41⁺ thrombozytären MPs (PMP) unterschieden werden (78).

CD41a ist auch bekannt als Integrin α IIb oder GPIIb und wird auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert. Im Komplex mit GPIIIa dient er als Rezeptor für Fibrinogen, Fibronektin und den von-Willebrand-Faktor und vermittelt Thrombozytenadhäsion und -aggregation. (83)

Der hier verwendete fluorochrom-konjugierte CD41a-Antikörper bindet spezifisch an CD41 und ermöglicht den Nachweis von Plättchen-generierten Mikropartikeln (PMP). In der vorliegenden Arbeit dient er der Differenzierung von CD31⁺/CD41⁺ PMPs und CD31⁺/CD41⁻ EMPs (s.o.)

CD144, auch VE-Cadherin (*vascular endothelium*) genannt, ist ein 140 kDa großes Protein, das zu der Cadherin-Familie der Zelladhäsionsmoleküle gehört (79). Das CD144-Antigen ist spezifisch für Endothelzellen, findet sich im Interzellularspalt des Endothels wieder und ist an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (80).

Wie CD31 zählt dieses Epitop zu den konstitutiven Markern von Endothelzellen. Eine gesteigerte Freisetzung von CD144⁺ EMP wird als Korrelat vermehrter struktureller Endothelzellschädigung gesehen. (81)

CD62E ist ein 97 – 115 kDa großes Zelloberflächenprotein, das auch unter dem Namen Endothel-Selektin (*E-Selectin*) oder *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)* bekannt ist. Vor allem wird das CD62E-Antigen von Zytokin-aktiviertem Endothel exprimiert und ist an der Interaktion von entzündetem Endothel mit Neutrophilen beteiligt (82).

In der Literatur wird er als induzierbarer EMP-Marker beschrieben, der ausschließlich bei Entzündung, nicht aber bei Apoptose, vermehrt nachweisbar ist (76).

1.5 Einfluss von Kakaoflavanolen auf das kardiovaskuläre System

Flavane sind natürlich vorkommende sekundäre Pflanzenstoffe und stellen eine Subgruppe der Flavonoide dar. Diese gehören zur Klasse der Polyphenole und haben ein flavonoides Grundgerüst, das aus zwei aromatischen Ringen, verbunden über eine C₃-Brücke, besteht.

Die einzelnen Untergruppen werden durch unterschiedliche Substituenten am C-Ring festgelegt und umfassen neben Flavanolen (Hydroxygruppe an C3) Flavone, Isoflavone, Flavanone und Anthocyanidine.

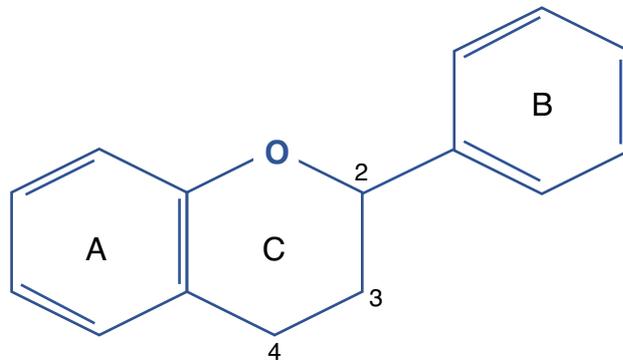


Abb. 2: flavonoides Grundgerüst

Flavonoide haben ein gemeinsames Grundgerüst. Es besteht aus zwei aromatischen Ringen, die über eine C₃-Brücke miteinander verbunden sind. Die einzelnen Flavonoid-Subgruppen definieren sich über verschiedene Substituenten am C-Ring.

Flavane können als Monomere sowie als Oligo- und Polymere (sog. Procyanidine) vorliegen und eine unterschiedliche Anzahl an Hydroxygruppen am B-Ring tragen. Durch die zwei Stereozentren an C₂ und C₃ können Flavanol-Monomere bei gleicher Hydroxylierung des B-Rings als vier Stereoisomere, beispielsweise (–) - Epicatechin, (+) - Epicatechin, (–) - Catechin und (+) - Catechin auftreten. (94)

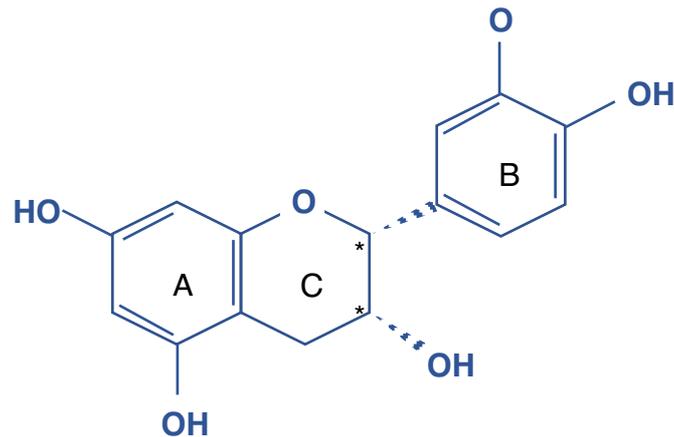


Abb. 3: Strukturformel des Flavanol-Monomers (–) - Epicatechin

Aufgrund der zwei Stereozentren (*) an C2 und C3 sind neben dem beispielhaft aufgezeichneten (–) - Epicatechin drei weitere Stereoisomere möglich; das (+) - Epicatechin, (–) - Catechin und (+) - Catechin.

Als Hauptquellen für Flavanole in der westlichen Ernährungsweise konnten Kakao, grüner und schwarzer Tee, Rotwein und Äpfel identifiziert werden. Der Gehalt der einzelnen Flavanolmonomere (beispielsweise (–) - Epicatechin, (+) - Epicatechin, (–) - Catechin und (+) - Catechin) und Flavanololigomere (Procyanidine) variiert in den Nahrungsmitteln und hängt bei Kakao oder Tee auch von deren Prozessierung ab (84,95). Der Anteil der im vorigen Satz aufgezählten Monomere an der Gesamtmenge der Mono- und Oligomere kann mit etwa 10 % angenommen werden (84). Insgesamt finden sich in Kakao, Wein und Tee vor allem (–) - Epicatechin, (+) - Catechin sowie Oligomere dieser Monomere, die auch als Procyanidine bezeichnet werden (96).

Größere Oligomere scheinen nicht resorbierbar zu sein und eher lokale Effekte im Darm als Immunmodulator oder durch Beeinflussung von Mikrobiota zu haben (84).

Mono- und Dimere hingegen werden über den Darm aufgenommen und erreichen ca. ein bis zwei Stunden nach Einnahme ihre Spitzenkonzentration im Blut (97). Für (–) - Epicatechin konnte gezeigt werden, dass es großen Anteil an der Vermittlung der Effekte von flavanolreicher Nahrung hat. In einer diätetischen Interventionsstudie mit flavanolreichem Kakao konnte (–) - Epicatechin als

unabhängiger Prädiktor für die vaskuläre Wirkung des Kakaos bestimmt werden (86).

Epidemiologische Studien zeigen, dass der Konsum flavanolreicher Lebensmittel invers mit dem kardiovaskulären Risiko korreliert (84,85). Zudem zeigen diätetische Interventionsstudien, dass die (einwöchige) Einnahme von Kakaoflavanolen zu einer Verbesserung der Endothelfunktion mit Steigerung der FMD und Verbesserung der Mikrozirkulation bei bestehender endothelialer Dysfunktion beiträgt (86,87).

Infolge einer mehrtägigen Flavanol-Diät ist neben einer kurzfristigen Verbesserung der Endothelfunktion kurz nach Flavanoleinnahme auch eine längerfristige Steigerung der FMD mehr als 12 Stunden nach Flavanoleinnahme messbar, obwohl der Großteil der zirkulierenden Flavanolmetabolite bereits ausgeschieden ist (87,88).

Außerdem führen Flavanole zu einer verminderten Thrombozytenaggregation und einer Senkung von systolischem und diastolischem Blutdruck. (89), (90) Über die Zunahme der CAC unter flavanolreicher Diät nehmen Flavanole möglicherweise auch Einfluss auf vaskuläre Reparaturprozesse und Angiogenese. (91)

Der exakte Mechanismus, über den Flavanole positive Effekte auf das kardiovaskuläre System ausüben, ist nicht abschließend aufgedeckt. Jedoch scheint das Endothel wichtig für die Vermittlung der oben beschriebenen Flavanolwirkung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine flavanolreiche Diät zu einer vermehrten Bioverfügbarkeit von NO mit gesteigerter FMD führt (86).

Die kurzfristige Wirkung von Flavanolen scheint vor allem durch ihre antioxidative Komponente vermittelt zu werden. Indem Flavanole die endotheliale NADPH-Oxidase inhibieren, kommt es zu einer verminderten NO-Inaktivierung durch freie Radikale.

Langfristige Effekte von Flavanolen auf eine gesteigerte NO-Verfügbarkeit scheinen aus einer erhöhten eNOS-Expression zu resultieren. (92,93)

1.6 Ziele dieser Arbeit

Mit der Hypothese, dass Kakaoflavanole über eine Verbesserung der Dysfunktion endothelialer Zellen die Entstehung von Atherosklerose beeinflussen können, führten wir eine Woche vor sowie eine Woche nach transradialer Herzkatheteruntersuchung bei der Hälfte unserer Studienteilnehmer eine Kakaoflavanol-Supplementierung durch. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Kakaoflavanolen auf die funktionelle und strukturelle Gefäßantwort nach Endothelverletzung infolge einer transradialen Herzkatheteruntersuchung zu untersuchen.

Spezifische Ziele waren, durch periinterventionelle Supplementierung von Kakaoflavanolen:

1. eine Verbesserung der flussmedierten Vasodilatation der *A. radialis* vor Herzkatheteruntersuchung zu erreichen.
2. eine Verminderung des akuten Endothelschadens nach transradialer Herzkatheteruntersuchung nachzuweisen.
3. eine Reduktion der langfristigen Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung zu erzielen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll

Die vorliegende diätetische Interventionsstudie wurde randomisiert, placebokontrolliert und doppelt verblindet im Parallelgruppendesign durchgeführt. Die Supplementierung der Kakaoflavanole startete eine Woche vor und endete eine Woche nach transradialer Herzkatheteruntersuchung.

Primärer Endpunkt war die Untersuchung des Ausmaßes der sonographisch gemessenen Intima-Media-Hyperplasie unmittelbar proximal der Punktionsstelle der *A. radialis* sechs Monate nach Herzkatheteruntersuchung verglichen mit der Intima-Media-Dicke zu Studienbeginn.

Sekundärer Endpunkt war die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der als Maß für die Endothelfunktion der punktierten *A. radialis* bestimmten FMD, gemessen vor und nach einwöchiger Flavanol-Supplementation sowie zwei Stunden und sechs Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung.

Tertiärer Endpunkt war die Beurteilung des postinterventionellen *Remodelings* der punktierten *A. radialis*, gemessen anhand des inneren und äußeren Gefäßdurchmessers.

Quartärer Endpunkt war der zeitliche Verlauf der EMP-Plasmaspiegel gemessen vor und nach einwöchiger Flavanol-Intervention sowie zwei Stunden nach transradialer Herzkatheteruntersuchung.

Innerhalb von sechs Monaten fanden insgesamt vier Untersuchungen statt, die zu jedem Zeitpunkt und für beide Gruppen identisch durchgeführt wurden. Bei jeder Untersuchung wurden neben Herzfrequenz und Blutdruck die flussmedierte Vasodilatation (FMD), die Intima-Mediadicke (IMT) sowie der Außen- und Innendiameter der *A. radialis* erfasst. Zu den ersten drei Zeitpunkten wurde außerdem Blut für die Messung des Plasmaspiegels endothelialer Mikropartikel entnommen.

Eine Woche vor geplanter transradialer Herzkatheteruntersuchung und vor Beginn der diätetischen Intervention fand die basale Untersuchung (*baseline*) statt. Zuvor war durch den Untersucher per Münzwurf die doppelt verblindete Randomisierung vorgenommen worden. Außerdem wurden eine kurze Anamnese sowie verschiedene laborchemische Parameter (siehe Tabelle 3) erhoben. Anschließend erhielten die Patienten, entsprechend ihrer randomisiert und doppelt verblindet erfolgten Gruppeneinteilung, periinterventionell für zwei Wochen zwei Mal täglich flavanolreiche Test-Kapseln (2 x 410 mg Kakaoflavanole / Tag) oder optisch und geschmacklich davon nicht unterscheidbare flavanolfreie Placebo-Kapseln. Rationale für das präinterventionelle einwöchige „*Loading*“ war, eine möglichst stabil erhöhte Endothelfunktion zu erzielen, die unabhängig von Flavanolplasmaspiegeln ist (87,91).

Unmittelbar vor der transradialen Herzkatheteruntersuchung, dem siebten Tag der Kakaoflavanol-Supplementierung entsprechend, wurden die Studienteilnehmer erneut in gleicher Weise untersucht. Für die transradiale Herzkatheteruntersuchung wurde bei allen Patienten eine 6 F Schleuse verwendet.

Im Anschluss an die vollständige Entlastung des zum Schleusenzug verwendeten TR-Bandes® (Terumo Corporation, Tokio, Japan) zwei Stunden nach beendeter Koronarangiographie wurde die dritte Untersuchung durchgeführt.

Die Einnahme der Test-Kapseln wurde für eine weitere Woche fortgeführt, um während der Heilungsphase den hohen Plasmaspiegel an Kakaoflavanolen aufrechtzuerhalten.

Nach sechs Monaten wurden die Studienteilnehmer zu einer abschließenden Verlaufsuntersuchung, die wie oben beschrieben erfolgte, eingeladen.

Die Studienpatienten wurden den Regeln des Universitätsklinikums Düsseldorf entsprechend umfassend aufgeklärt. Die Einwilligung in Untersuchung, Auswertung der pseudonymisierten Daten und Veröffentlichung der Studienergebnisse wurde schriftlich fixiert. Für das Studienprotokoll lag eine Genehmigung der

Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studiennummer 3574).

Die Studie ist auf der Internetplattform *clinicaltrials.gov* unter der Studiennummer NCT03488823 registriert.

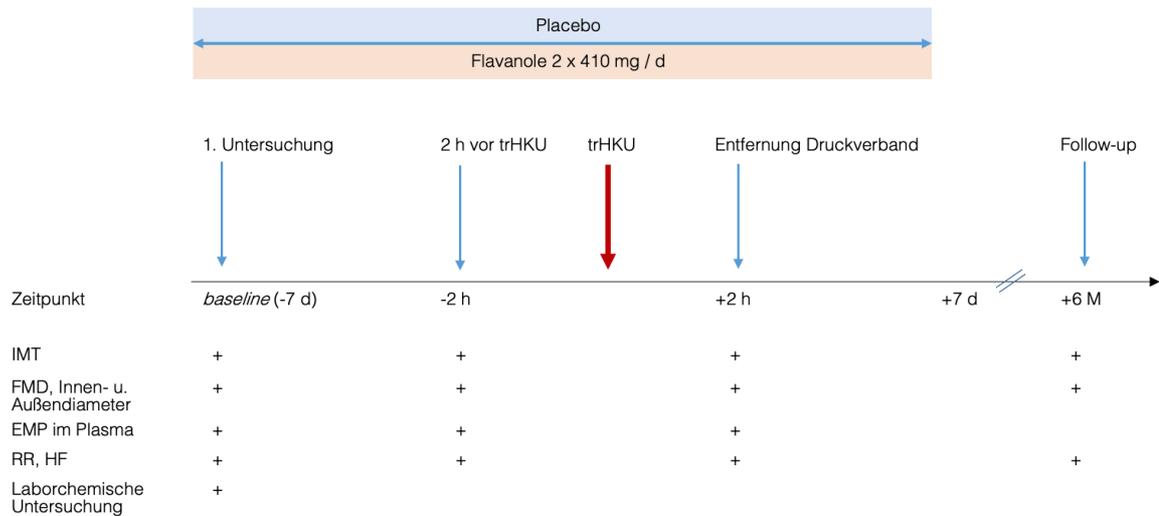


Abb. 4: Studienprotokoll

Die vorliegende diätetische Interventionsstudie wurde randomisiert, placebokontrolliert und doppelt verblindet im Parallelgruppendesign durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten jeweils eine Woche (*baseline*) und zwei Stunden (-2 h) vor sowie zwei Stunden (+2 h) und sechs Monate (+6 M) nach transradialer Herzkatheteruntersuchung (trHKU). Nach der ersten Untersuchung begann die zweiwöchige periinterventionelle Einnahme von Placebo bzw. Kakaoflavanolen. Erhoben wurden die Intima-Media-Dicke (IMT), die flussmedierte Vasodilatation (FMD), der äußere und innere Gefäßdiameter, Blutdruck (RR) und Herzfrequenz (HF). Das Blut wurde laborchemisch sowie auf endotheliale Mikropartikel (EMP) untersucht.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Test-Kapseln

In Tabelle 1 sind die Inhaltsstoffe der flavanolhaltigen Kapseln und der Placebo-Kapseln aufgelistet.

Inhaltsstoff	Flavanolhaltige Kapsel	Placebo-Kapsel
Gesamtmenge Kakaoflavanole (mg)	410	0
Monomere (mg)	73	0
(-) – Epicatechin (mg)	64	0
(-) – Catechin (mg)	7	0
(+) – Catechin (mg)	2	0
(+) – Epicatechin (mg)	0	0
Dimere bis Dekamere (mg)	377	0
Theobromin (mg)	44	46
Koffein (mg)	10	6
Fett (g)	0	0
Kohlenhydrate (g)	6	6
Proteine (g)	0,1	0,1
Energie (kcal)	25	25
Natrium (mg)	3	3
Kalium (mg)	95	85

2.2 Studienkollektiv

In die vorliegende Studie wurden von Januar 2017 bis Dezember 2018 insgesamt 41 männliche Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf im Alter zwischen 50 und 75 Jahren eingeschlossen, bei denen eine elektive transradiale Koronarangiographie geplant war.

Als allgemeine Ausschlusskriterien wurden akute Entzündung (definiert als Erhöhung des C-reaktiven Proteins > 0,5 mg/dl), fortgeschrittene Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) und akute oder chronische Niereninsuffizienz (GFR < 60 ml) formuliert.

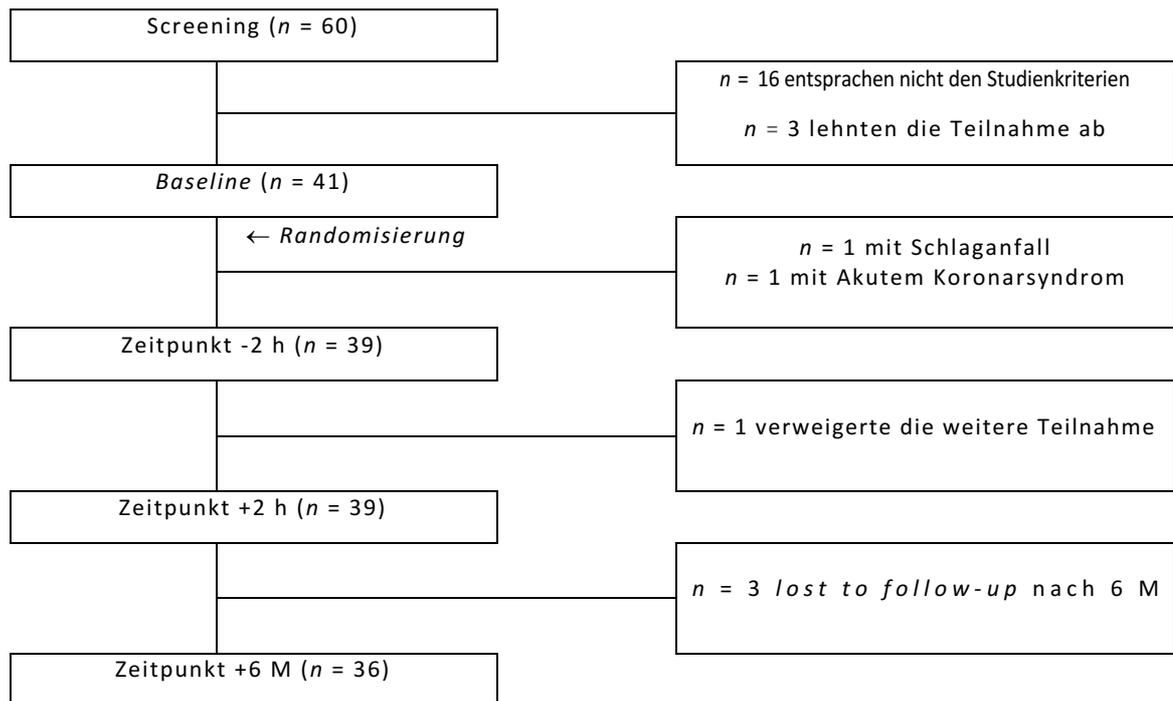


Abb. 5: Fluss der Studienteilnehmer

Von 60 *Gescreenten* wurden 16 wegen Nicht-Erfüllung der Studienkriterien und drei wegen Ablehnung einer Teilnahme ausgeschlossen, so dass letztlich 41 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. In der Ausgangsuntersuchung (*baseline*) erfolgte die doppelt blinde Randomisierung. Zwei der eingeschlossenen Studienpatienten mussten wegen Schlaganfalls bzw. akuten Koronarsyndroms zwischen *baseline*-Untersuchung und Zeitpunkt -2 h die Studienteilnahme abbrechen. Ein Patient verweigerte nach Zeitpunkt -2 h die weitere Studienteilnahme. Drei weitere Patienten erschienen nicht zur Verlaufsuntersuchung nach sechs Monaten, sodass letztlich 36 Patienten die Studie vollständig durchliefen.

2.3 Angiologische Untersuchungen

Die angiologischen Untersuchungen umfassten ausschließlich nicht-invasive Verfahren. Die Quantifizierung der Gefäßfunktion mittels Bestimmung der FMD, die Messung der IMT sowie der Gefäßdiameter erfolgten durch Ultraschalluntersuchung der Radialarterie im *B-Mode*.

Zuvor waren Blutdruck und Herzfrequenz bestimmt worden.

2.3.1 Messbedingungen

Um möglichst konstante Messbedingungen für valide FMD-Ergebnisse (44–46) zu schaffen, wurden die Messungen in einem ruhigen, abgedunkelten Raum bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 °C nach zehnmütiger Ruhephase der Patienten durchgeführt. 24 Stunden vor den Untersuchungen sollten die Studienpatienten keinen übermäßigen Sport treiben. Durch das Studienprotokoll bedingt fanden die Untersuchungen zu unterschiedlichen Tageszeiten statt.

Zur internen Qualitätssicherung wurden die Untersuchungen jeweils von derselben Person durchgeführt, die zuvor ein ca. 100 Probemessungen umfassendes, supervidiertes Training absolviert hatte.

2.3.2 Bestimmung des Blutdrucks und der Herzfrequenz

An jedem der vier Untersuchungszeitpunkte wurde vor Messung der FMD auskultatorisch nach Korotkoff der Ruheblutdruck ermittelt. Dazu wurde den Patienten ca. 2,5 cm proximal der Ellenbeuge eine luftleere Manschette in passender Größe angelegt. Der anschließend angelegte Manschettendruck wurde um 2-3 mmHg pro Sekunde reduziert. Nach fünf Minuten wurde die Messung wiederholt und der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet. Anschließend wurde die Herzfrequenz bestimmt.

2.3.3 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels FMD

Für die Ultraschalluntersuchung der Armgefäße befanden sich die Patienten in Rückenlage bei 30° erhöhtem Oberkörper. Den Unterarmen, die streckseitig auf der

Untersuchungsliege auflagen, wurde knapp unterhalb der Ellenbeuge eine konventionelle Blutdruckmanschette angelegt. Um eine EKG-getriggerte Auswertung der Ultraschallbilder zu ermöglichen, wurde kontinuierlich ein 3-Kanal-EKG nach Einthoven abgeleitet.

Die *A. radialis* wurde ein bis zwei Zentimeter distal des Handgelenks mit einem 13 MHz Linearschallkopf (VIVID i, GE *Healthcare*, Solingen, Deutschland) longitudinal im *B-Mode* dargestellt. Hautmarkierungen gewährleisteten die exakte Beibehaltung der Ausgangsposition des Schallkopfs für die gesamte Untersuchungsdauer. Zusätzlich erfolgte eine Orientierung an Landmarken im Ultraschallbild.

Nach Optimierung der Bildeinstellung wurde eine über drei Herzzyklen andauernde Sequenz aufgenommen und gespeichert, um den initialen Gefäßdurchmesser der *A. radialis* (basaler Diameter) zu ermitteln.

Anschließend wurde in der zuvor am proximalen Unterarm positionierten Blutdruckmanschette für fünf Minuten ein suprasystolischer Druck von 200 mmHg angelegt und somit eine Ischämie des Armes in für die FMD-Messung ausreichendem Ausmaß (45,46) induziert. Schallkopfposition und Bildeinstellungen wurden exakt beibehalten.

Nach Entlastung der Manschette wurde die Flussgeschwindigkeit erneut über mehrere Herzzyklen gemessen. 20, 40, 60 und 80 Sekunden später wurden wieder über drei Herzzyklen andauernde, ca. drei bis fünf sekundenlange Sequenzen aufgenommen, um aus diesen den maximalen Diameter der *A. radialis* nach Ischämie und Reperfusion zu bestimmen. Die maximale postischämische Vasodilatation wird in der Literatur (s. (98)) nach 45 - 80 Sekunden erwartet.

Die zuvor beschriebene Messung der FMD wurde stets zuerst an der rechten, anschließend an der linken *A. radialis* durchgeführt.

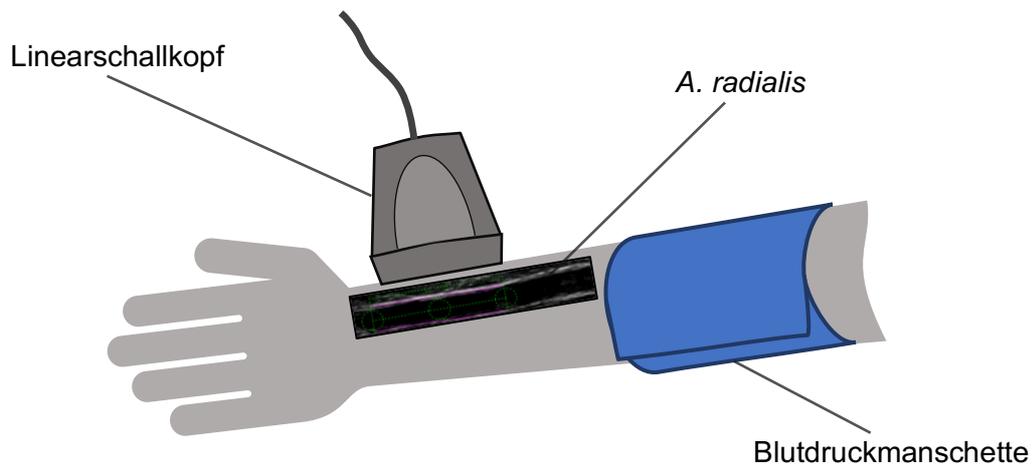


Abb. 6: Durchführung der FMD-Messung

Am proximalen Unterarm wird eine Blutdruckmanschette angelegt. Ein bis zwei Zentimeter distal des Handgelenkes wird die *A. radialis* im *B-Mode* dargestellt und die Position des Linearschallkopfes auf der Haut markiert. Mittels Anlage eines suprasystolischen Drucks in der Blutdruckmanschette wird eine fünfminütige iatrogene Ischämie des Arms induziert. Infolge der anschließenden Entlastung kommt es zu einer reaktiven Hyperämie mit erhöhter Wandscherspannung. Diese aktiviert die endotheliale NO-Synthase mit konsekutiver NO-induzierter Vasodilatation. 20, 40, 60 und 80 Sekunden nach Druckentlastung werden *B-Mode*-Bilder der *A. radialis* zur Dokumentation der Vasodilatation aufgezeichnet.

2.4 Auswertung der Ultraschalluntersuchungen

2.4.1 Ermittlung der FMD

Die digitalen Ultraschallsequenzen wurden an einem herkömmlichen Computer mit Hilfe einer speziell für die FMD-Messung entwickelten und unabhängig validierten Software (*Vascular Research Tools 5 Brachial Analyzer; Medical Imaging Application, Iowa, USA*) semiautomatisch wie folgt ausgewertet (100),(101):

Nach manueller Kalibrierung wählte der Auswertende aus der Sequenz ein Einzelbild mit eindeutig abgrenzbaren Gefäßwänden, zu erkennen am charakteristischen Doppellinienmuster, und legte eine zwei bis drei Zentimeter große *region of interest (ROI)* fest. Der *Brachial Analyzer* markierte innerhalb der *ROI* automatisch die schallkopfnah und -ferne Media-Adventitia-Grenze (sog. M-Linie, der EEM entsprechend), die manuell korrigiert werden konnte.

Nach diesem sog. *Training* detektierte die Software in allen 100-150 B-Mode-Bildern die M-Linien automatisch und errechnete aus der Distanz zweier gegenüberliegender Punkte bei orthogonal aufgenommenem Gefäß dessen Diameter. Inkorrekt eingezeichnete M-Linien konnten manuell modifiziert werden. Das parallel aufgezeichnete, kontinuierliche EKG erlaubte die exakte Einordnung der Diameter in den Herzzeitzyklus: die R-Welle identifizierte den enddiastolischen und das Ende der T-Welle den endsystolischen Gefäßdiameter.

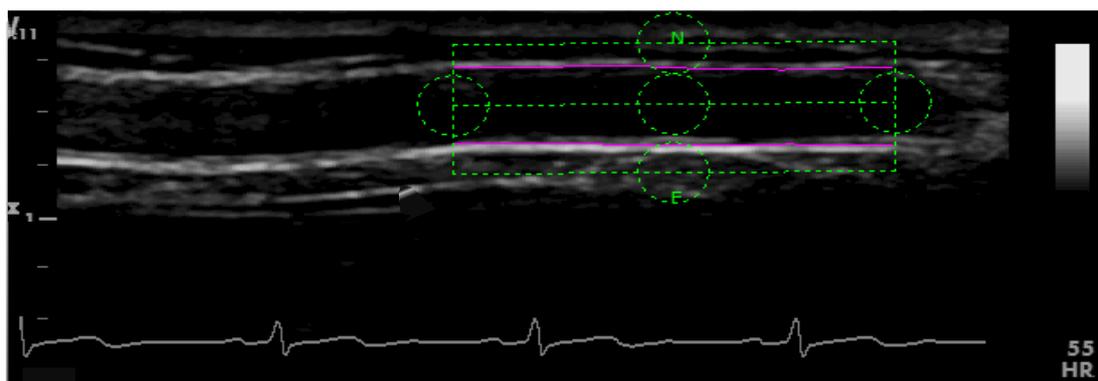


Abb. 7: FMD-Messung mittels *Brachial Analyzer Software*

Manuelle Auswahl der *region of interest (ROI)*, grüne Markierung) mit automatischer Erkennung der schallkopfnahen und -fernen M-Linien (magenta).

Der Durchmesser des Gefäßes zu den einzelnen Zeitpunkten (Basal und 20/40/60/80 s postischämisch) wurde aus dem Mittelwert dreier enddiastolischer Durchmesser bestimmt. Der höchste postischämische Wert (d_{max}) ist hierbei dem absoluten maximalen FMD-Wert gleichzusetzen.

Der relative maximale FMD-Wert ergab sich aus dem Verhältnis von maximaler postischämischer Durchmesserzunahme ($d_{max} - d_{basal}$) zum basalen Durchmesser:

$$FMD(\%) = \frac{(d_{max} - d_{basal})}{d_{basal}} * 100$$

2.4.2 Ermittlung der IMT

In den gleichen Bildsequenzen, die zur Ermittlung des basalen Gefäßdurchmessers (s. 2.4.1) verwendet wurden, erfolgte die Vermessung der IMT mittels *Vascular Research Tools 5 Brachial Analyzer*. Die *ROI* wurde analog zum zuvor beschriebenen Vorgehen (vgl. 2.4.1) in einem Bild mit eindeutig erkennbaren Gefäßwänden definiert, schloss hier jedoch lediglich die schallkopferne Gefäßwand ein. Innerhalb der *ROI* detektierte die Software die M-Linie sowie die Grenze von Intima-Media-Komplex zu Gefäßlumen, die manuell korrigiert werden konnten. Anschließend markierte die Software in allen weiteren Bildern der Sequenz die zuvor festgelegten Grenzen automatisch und errechnet aus der Distanz zweier gegenüberliegender Punkte die IMT. Von drei enddiastolisch gemessenen IMT-Werten wurde der Mittelwert gebildet.

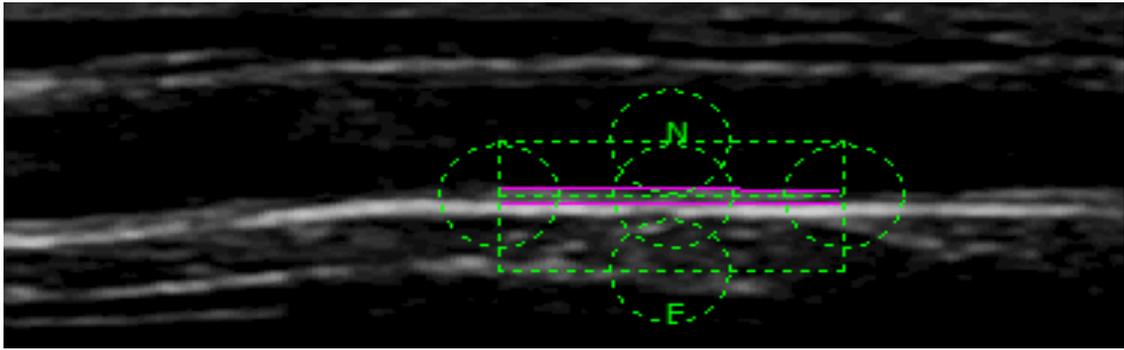


Abb. 8: IMT-Messung mittels *Brachial Analyzer Software*

Nach manueller Auswahl der *region of interest (ROI)*, grüne Markierung) folgte die automatisierte Detektion der Grenzen des Intima-Media-Komplexes (magenta).

2.4.3 Ermittlung des inneren und äußeren Diameters

Der äußere Diameter der *A. radialis* wurde dem für die FMD enddiastolisch ermittelten basal Diameter gleichgesetzt.

Die Ermittlung des enddiastolischen inneren Diameters erfolgte durch zweifache Subtraktion der IMT vom äußeren (basalen) Diameter.

$$d_{innen} = d_{basal} - 2 * IMT$$

2.5 Blutentnahme und Gewinnung von plättchenfreiem Plasma

Vor Messung der FMD erfolgte die Entnahme von circa fünf Millilitern Blut in Citrat-beschichtete Röhrchen (BD Vacutainer® Citratröhrchen 2,7 ml, Becton Dickinson GmbH, Plymouth, UK) aus der linken Kubitalvene mittels eines 21 G messenden Butterflys (BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blutentnahmeset, Becton Dickinson GmbH, Plymouth, UK). Die ersten zwei Milliliter Blut wurden verworfen. Es wurde auf eine möglichst kurze und geringe Stauung, den vertikalen und erschütterungsarmen Transport sowie die Weiterverarbeitung der Proben innerhalb von zwei Stunden geachtet, um präanalytische Fehler zu minimieren. (103)

Das Blut wurde in 15 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One™ CELLSTAR™ Test Tubes, Thermo Fisher Scientific, Göteborg, Schweden) transferiert und für 15 Minuten bei 300 g und 20 °C zentrifugiert. Von dem Plasmaüberstand wurden unter vorsichtiger Aspiration 1.000 μ l in 1,5 ml-Eppendorfgefäße (SafeSeal Gefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für fünf Minuten bei 20 °C und 10.000 g zentrifugiert, um plättchenfreies Plasma (*platelet free plasma*, PFP) zu gewinnen. Von diesem wurden 650 μ l in 1,5 ml-Eppendorfgefäße transferiert und bei - 80 °C gelagert.

Anhand durchflusszytometrischer Verfahren und fluoreszenzbasierter Laser-Scanning-Mikroskopie konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass das durch die zuvor beschriebene sequentielle Zentrifugation abgetrennte Plasma Mikropartikel, aber keine Thrombozyten enthält (104).

2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Methode der Wahl zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung von Mikropartikel-Populationen ist die Durchflusszytometrie (105). Der Einsatz fluoreszierender monoklonaler Antikörper gegen die entsprechenden Epitope auf den Mikropartikeln erlaubt hierbei die Identifizierung verschiedener Subpopulationen.

2.6.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Mikropartikel-Subpopulation

Die bei -80 °C gelagerten PFP-Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels Vortex sanft durchmischt. Anschließend wurden 90 μl PFP mit 910 μl calciumfreier *phosphate-buffered saline* (PBS) verdünnt und mittels Vortex homogen vermischt. Diese Lösung wurde in fünf verschiedenen FACS-Röhrchen (*tubes*) jeweils mit 20 μl Fluoreszenz-markierten Antikörper oder deren Isotypkontrollen (nach Vermischung mittels Vortex) für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es wurden also pro Patienten und Untersuchungszeitpunkt fünf verschiedene Proben angesetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Ansätzen je 300 μl PBS hinzugefügt und mittels Vortex miteinander vermengt. Für die FACS-Analyse wurde das BD FACSVerse™ Durchflusszytometer verwendet. Für das bei der Analyse entnommene Volumen wurde ein anhand von Vorarbeiten rechnerisch ermitteltes Standardvolumen angenommen. Kalibrierung und Reinigung wurden wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Durch den Einsatz von je 60 μl *Microbead NIST Traceable Particle Size Standard* 1,00 μm (64030; Polyscience, Inc., Warrington, USA), im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt, konnten Mikropartikel als *Events* $\leq 1 \mu\text{m}$ definiert werden.

Um die Hintergrundsignale der spezifischen Antikörper zu diskriminieren, wurde für jeden verwendeten Antikörper ein entsprechender Isotyp als Negativkontrolle eingesetzt. Zum Herausrechnen der Hintergrundsignale wurden die Messergebnisse der Isotypkontrollen von denen der spezifischen Antikörper

subtrahiert. Die Überprüfung der mit Phycoerythrin (PE) markieren Antikörper erfolgte durch den Isotypen IgG1-Mouse-PE und die der mit PE-CyTM5 markieren durch den Isotypen IgG1-Mouse-PE-CyTM5.

Ein Überblick über die verwendeten Antikörper bzw. deren Isotypen findet sich, sortiert nach Probenansatz, in Tabelle 2.

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Antikörper bzw. Isotyp-Kontrollen und deren Funktionen

Zu den 100 μ l verdünntem plättchenfreien Plasma (PFP) wurden die in der Tabelle aufgelisteten Substanzen hinzugefügt. Eine Zeile entspricht einem Tube, so dass insgesamt pro Patient und Zeitpunkt fünf Proben angesetzt wurden. Neben dem Namen des Reagens ist seine Funktion aufgeführt.

<i>Tube</i>	Reagens	Funktion
1	60 μ l Microbeads standard 1 μm (dilute 1:100) (64030; Polyscience, Inc., Warrington, USA)	Größenkalibrierung
2	20 μ l CD41a-PE-CyTM5 + 20 μ l CD31-PE (559768; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland + IM2409; Beckman Coulter, Brea, USA)	EMP PMP
3	20 μ l IgG1-Mouse-PE-CyTM5 + 20 μ l IgG1-Mouse-PE (555750; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland + A07796; Beckman Coulter, Brea, USA)	Isotyp-Kontrolle
4	20 μ l CD144-PE (A07481, Beckman Coulter, Brea, USA)	EMP
5	20 μ l CD62E-PE (551145, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)	EMP

2.6.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Auswertung der durchflusszytometrisch ermittelten Daten erfolgte mittels BD FACSuiteTM- Software.

Um die untere Nachweisgrenze festzulegen, wurde für jeden verwendeten Antikörper ein entsprechender Isotyp als Negativkontrolle verwendet. Die obere Grenze wurde anhand von Eichpartikeln (*Microbeads*) mit einer festen Größe von 1 μ m kalibriert.

Um elektronisches Rauschen nicht mitzumessen, wurde eine Schwellenparameter über das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) definiert. Sobald diese Signalstärke von einem Partikel überschritten wurde, wurde es als *event* gezählt.

Die EMP wurden also anhand der im *forward scatter* gemessenen, zwischen 0,1 und 1 μm definierten Größe, der im Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) analysierbaren Dichte und des Fluoreszenzverhaltens nach Antikörpermarkierung detektiert und den oben aufgezählten Subpopulationen zugeordnet.

2.7 Klinisch-chemische Laborparameter

Am ersten Studientag erfolgte einmalig die Abnahme eines Routinelabors zur Beurteilung von Blutbild, Elektrolyten und verschiedenen Stoffwechselfparametern. Analyse und Auswertung dieser erfolgte durch das Institut für klinische Chemie und Labordiagnostik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die erhobenen Laborparameter sind in Kapitel 3 Tabelle 3 aufgelistet.

2.8 Biometrie und Anamnese

In der Anamnese, die einmalig am ersten Studientag durchgeführt wurde, wurden die Patienten nach aktueller Körpergröße und -gewicht, Nikotinkonsum und ggf. bei ehemaligen Rauchern nach Zeit der Karenz gefragt. Von den anamnestisch und aus Arztbriefen eruierten Vorerkrankungen wurden eine KHK, Herzinsuffizienz (NYHA-Klassifikation) und Diabetes mellitus erfasst.

2.9 Mathematisch-statistische Verfahren

Deskriptive statistische Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler bzw. als Mittelwert mit 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Der Vergleich basaler Charakteristika zwischen der Flavanol-Gruppe und der Placebo-Gruppe wurde mittels zweiseitigem *student's t-test* für unverbundene Proben durchgeführt. Alle weiteren inter- und intraindividuellen Vergleiche wurden mittels Zwei-Wege ANOVA für Messwiederholungen mit Zwischensubjekt-Faktor erstellt. Es wurde ein Signifikanz-Niveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt. Mit Ausnahme der mittels der Software *G*Power* durchgeführten *post-hoc Power-Analyse* wurden alle statistischen Tests mit der Software SPSS durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die vorliegende diätetische Interventionsstudie wurde randomisiert, placebokontrolliert und doppelt verblindet im Parallelgruppendesign durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten jeweils eine Woche (*baseline*) und zwei Stunden (-2 h) vor sowie zwei Stunden (+2 h) und sechs Monate (+6 M) nach transradialer Herzkatheteruntersuchung. Nach der ersten Untersuchung (*baseline*) begann die zweiwöchige periinterventionelle Einnahme von Placebo-Kapseln bzw. Kakaoflavanolen. Erhoben wurden die IMT, die FMD, der äußere und innere Gefäßdiameter, Blutdruck und Herzfrequenz. Das Blut wurde laborchemisch sowie auf endotheliale Mikropartikel untersucht.

3.1 Patientencharakteristika

In beiden Gruppen durchliefen jeweils 18 Patienten die Studie vollständig. Die beiden Gruppen unterschieden sich in ihren Charakteristika nicht signifikant.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Studienpopulation (A) und prozedurale Spezifika (B)
 Angegeben werden Mittelwert (Mittel), Standardabweichung (SD) und der mittels zweiseitigem T-Test für unverbundene Stichproben ermittelte Signifikanzwert für die Flavanol- und die Placebo-Gruppe.

	Flavanol (<i>n</i> = 18)		Placebo (<i>n</i> = 18)		<i>p</i>
	Mittel	SD	Mittel	SD	
(A) Alter	63,1	± 7,2	63,4	± 7,2	0,908
Gewicht (kg)	81,8	± 10,2	90,9	± 16,3	0,053
Körpergröße (cm)	176	± 10	178	± 10	0,487
BMI (kg/m ²)	26,3	± 2,9	28,6	± 4,5	0,083
Aktiver Raucher	0,8	± 0,4	0,8	± 0,4	0,684
Packungsjahre	20,7	± 17,9	23,3	± 21,9	0,698
Ehemalige Raucher (Nicht-Raucher seit)	12,1	± 11,6	7,3	± 8,4	0,170
Herzfrequenz (/min)	68	± 12,5	66	± 10,5	0,577
Blutdruck systolisch (mmHg)	145	± 16,5	146	± 17,0	0,824

Blutdruck diastolisch (mmHg)	85	± 7,4	82	± 7,7	0,369
Arterielle Hypertonie (%)	100	± 0	89	± 30	0,16
Diabetes mellitus (%)	11	± 30	39	± 50	0,058
KHK (%)	50	± 50	44	± 50	0,747
geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (ml/min)	73	±21	83	± 15	0,131
Harnstoff (mg/dl)	32	± 7	31	± 8	0,695
Harnsäure (mg/dl)	6,0	± 1	6,1	± 1,5	0,881
Gesamtcholesterin (mg/dl)	202	± 39	176	± 37	0,073
Triglyzeride (mg/dl)	212	± 118	179	± 158	0,527
HDL-C (mg/dl)	47	± 11	45	± 10	0,626
LDL-C (mg/dl)	148	± 42	118	± 41	0,053
C-reaktives Protein (mg/dl)	0,1	± 0,1	0,1	± 0,2	0,845
Leukozyten (x1000/ μ l)	6,4	± 1,5	6,3	± 1,3	0,828
Hämoglobin	14,6	± 1,1	14,7	± 0,9	0,961
Hämatokrit	44,3	± 3,3	44,5	± 3,1	0,837
Statin (%)	53	± 51	56	± 51	0,881
ACE-Hemmer (%)	44	± 51	72	± 46	0,096
Angiotensin-Rezeptor-Blocker (%)	22	± 43	17	± 38	0,684
Ca ²⁺ - Blocker (%)	17	± 38	28	± 46	0,437
Betablocker (%)	56	± 51	67	± 49	0,508
Acetylsalicylsäure (%)	39	± 50	56	± 51	0,331
Clopidogrel (%)	6	± 24	6	± 24	1,0
Ticagrelor (%)	0	± 0	11	± 32	0,163
Prasugrel (%)	6	± 24	6	± 24	1,0
(B) Heparin (I.E)	4000	± 2086	3944	± 1304	0,924
Koronarintervention (%)	6	± 20	6	± 20	1,0
Kontrastmittel (ml)	79	± 60	83	± 33	0,833
Dosisflächenprodukt (cGy*cm ²)	2641	± 2117	3885	± 2849	0,146
Durchleuchtungsdauer (min)	7,8	± 5,4	7,9	± 6,2	0,968
6 F Schleuse (n)	18		18		

3.2 Ergebnisübersicht der vier Endpunkte

Tabelle 4: Gefäßfunktionelle und -strukturellen Parameter sowie die Plasmakonzentration der endothelialen Mikropartikel zu Beginn der Studie (*baseline*), zwei Stunden vor (-2 h), zwei Stunden (+2 h) sowie sechs Monate (+6 M) nach transradialer Herzkatheteruntersuchung und deren absolute Änderung (Delta) zum Ausgangswert (*baseline*)

Angegeben werden Anzahl (*n*), Mittelwert und Standardfehler (*SEM*) für Flavanol- und für Placebo-Gruppe. Erhoben wurden die flussvermittelte Vasodilatation (FMD), die Intima-Media-Dicke, äußerer und innerer Gefäßdiameter, sowie die Plasmakonzentration verschiedener Subpopulationen endothelialer Mikropartikel. Die Änderung (Delta) der Zeitpunkte -2 h, +2 h und 6 M zum Ausgangswert (*baseline*) wird zusammen mit dem 95%-Konfidenzintervall (95% KI) angegeben. Signifikanzen sind fett hervorgehoben.

	Flavanol (n = 18)				Placebo (n = 18)				Flavanol (n = 18)			Placebo (n = 18)		
	Mittelwert ± SEM				Mittelwert ± SEM				Mittelwert Delta mit [95% KI]			Mittelwert Delta mit [95% KI]		
	<i>baseline</i>	-2 h	+2 h	+ 6 M	<i>baseline</i>	-2 h	+2 h	+ 6 M	Delta -2 h zu <i>baseline</i>	Delta +2 h zu <i>baseline</i>	Delta +6 M zu <i>baseline</i>	Delta -2 h zu <i>baseline</i>	Delta +2 h zu <i>baseline</i>	Delta + 6 M zu <i>baseline</i>
primärer Endpunkt														
Intima-Media Dicke (mm)	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,001 [-0,004; 0,007]	0,001 [-0,005; 0,008]	0,013 [-0,001; 0,026]	-0,004 [-0,009; 0,002]	0,002 [-0,004; 0,009]	0,074 [0,061; 0,088]
sekundärer Endpunkt														
FMD (%)	9,2 ± 0,3	11,2 ± 0,5	5,9 ± 0,6	8,9 ± 0,4	8,4 ± 0,3	8,4 ± 0,5	4,3 ± 0,6	7,7 ± 0,4	2,0 [1,2; 2,7]	-3,3 [-4,6; -2,0]	-0,3 [-0,7; 0,1]	-0,0 [-0,8; 0,7]	-4,2 [- 5,5; -2,9]	-0,7 [-1,1; -0,3]
FMD kontralateral (%)	8,7 ± 0,3	10,9 ± 0,4	8,8 ± 0,4	8,9 ± 0,3	8,6 ± 0,3	8,5 ± 0,4	8,0 ± 0,4	8,2 ± 0,3	2,2 [1,6; 2,9]	0,2 [-0,5; 0,9]	0,3 [-0,2; 0,7]	-0,1 [-0,8; 0,6]	-0,5 [-1,2; 0,2]	-0,4 [-0,9; 0,1]
tertiärer Endpunkt														
innerer Diameter (mm)	1,83 ± 0,08	1,79 ± 0,07	1,96 ± 0,10	1,77 ± 0,08	2,02 ± 0,09	2,06 ± 0,09	2,25 ± 0,14	1,95 ± 0,10	-0,04 [-0,13; 0,05]	0,12 [-0,03; 0,27]	-0,06 [-0,16; 0,03]	0,03 [-0,06; 0,13]	0,22 [0,07; 0,36]	-0,07 [-0,16; 0,02]
äußerer Diameter (mm)	2,56 ± 0,09	2,52 ± 0,08	2,68 ± 0,13	2,52 ± 0,10	2,76 ± 0,09	2,79 ± 0,08	2,98 ± 0,13	2,84 ± 0,10	-0,04 [-0,13; 0,06]	0,13 [-0,02; 0,27]	-0,04 [-0,13; 0,05]	0,03 [-0,07; 0,12]	0,22 [0,07; 0,37]	0,08 [-0,01; 0,17]
quartärer Endpunkt (n = 13)														
EMP CD31*41 (events/μl)	607 ± 28	465 ± 26	628 ± 27		595 ± 28	585 ± 26	675 ± 27		-142 [-204; -80]	21 [-12; 54]		-9 [-71; 53]	81 [48; 114]	
EMP CD144* (events/μl)	749 ± 24	665 ± 19	745 ± 35		713 ± 24	746 ± 19	802 ± 35		-84 [- 126; -42]	-4 [-45; 37]		33 [-9; 75]	89 [48; 130]	
EMP CD65E* (events/μl)	611 ± 21	539 ± 25	651 ± 26		618 ± 21	601 ± 25	687 ± 26		-72 [-103; -41]	40 [-16; 96]		-17 [-48; 14]	69 [14; 125]	

3.3 Einfluss der Kakaoflavanole auf die Endothelfunktion (FMD) vor und nach transradialer Herzkatheteruntersuchung

Die Endothelfunktion der *A. radialis*, gemessen als FMD, war vor Flavanol-Intervention am Katheterarm in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied (9,2 %, 95% KI [8,5; 9,9] vs. 8,4 %, 95% KI [7,8; 9,1]).

Nach einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung stieg die FMD innerhalb der Flavanol-Gruppe signifikant an (+2,0 %, 95% KI [1,2; 2,7]), während in der Placebo-Gruppe nach einer Woche keine signifikante Änderung der FMD feststellbar war (0,0 %, 95% KI [-0,8; 0,7]).

Nach transradialer Herzkatheteruntersuchung kam es sowohl in der Flavanol-Gruppe (-3,3 %, 95% KI [-4,6; 2,0]) als auch in der Placebo-Gruppe (-4,2 %, 95% KI [-5,5; -2,9]) zu einem signifikanten Abfall der FMD verglichen mit dem Ausgangswert.

In der Verlaufsuntersuchung nach sechs Monaten war in der Flavanol-Gruppe keine signifikante Differenz zum Ausgangswert der FMD feststellbar (-0,3 %, 95% KI [-0,7; 0,1]), während die FMD in der Placebo-Gruppe signifikant verschlechtert blieb (-0,7 %, 95% KI [-1,1; -0,3]).

Sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte (p (*Zeit*) = 0,000) als auch die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit (p (*Zeit x Gruppe*) = 0,036) haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der FMD.

Änderung der FMD am Katheterarm

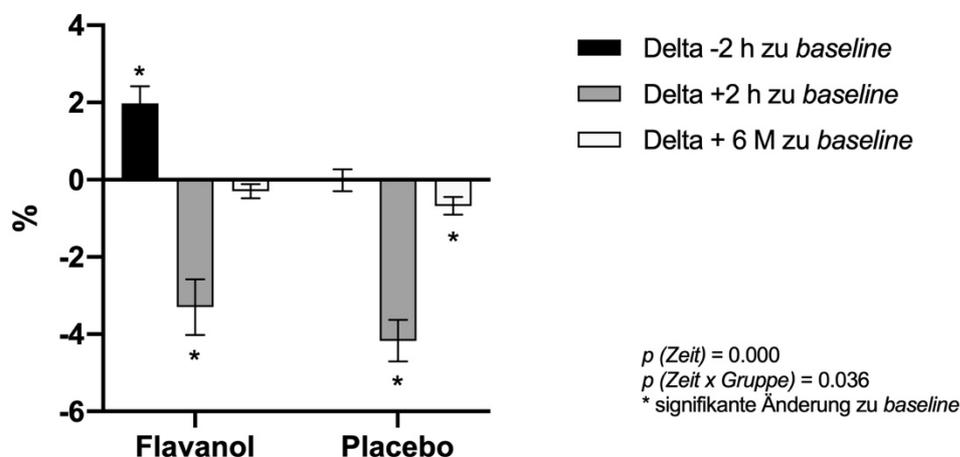


Abb. 9: Änderung der FMD der *A. radialis* am Katheterarm zwischen den Zeitpunkten -2 h, +2 h und 6 M zu *baseline*

Die Änderung der FMD zwischen Ausgangswert (*baseline*) sowie einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h), unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) und nach sechs Monaten (+6 M) wurde sowohl in der Flavanol- als auch in der Placebo-Gruppe untersucht. In der Flavanol-Gruppe kommt es nach einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h) zu einer signifikanten Verbesserung der FMD. Unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) ist in beiden Gruppen eine signifikante Verschlechterung der FMD verglichen zum Ausgangswert zu verzeichnen. Nach sechs Monaten (+6 M) bleibt die FMD in der Placebo-Gruppe signifikant verschlechtert. Sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,000$) als auch die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,036$) haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der FMD. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, *bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

Auch am Kontrollarm bestand zwischen den FMD-Werten der beiden Gruppen zum Ausgangszeitpunkt kein signifikanter Unterschied (8,7 %, 95% KI [8,1; 9,2] vs. 8,6 %, 95% KI [8,0; 9,1]). Signifikante intraindividuelle Unterschiede der FMD zwischen Katheterarm und Kontrollarm waren nicht zu verzeichnen.

In der Flavanol-Gruppe zeigte sich am Kontrollarm nach einwöchiger Flavanol-Intervention ebenfalls ein signifikanter Anstieg der FMD (+2,2 %, 95% KI [1,6; 2,9]).

Weitere signifikante Änderungen der FMD am Kontrollarm wurden zu keinem Zeitpunkt verzeichnet.

Auch hier haben sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,000$) als auch die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,007$) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der FMD.

Änderung der FMD am Kontrollarm

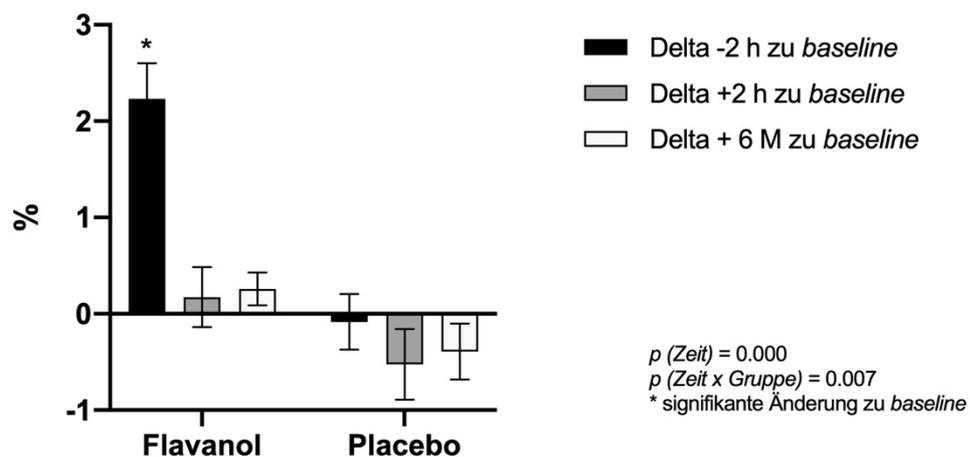


Abb. 10: Änderung (Delta) der FMD der *A. radialis* am Kontrollarm zwischen den Zeitpunkten -2 h, +2 h und 6 M zu *baseline*

Die Änderung der FMD am Kontrollarm zwischen Ausgangswert (*baseline*) sowie einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h), unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) und nach sechs Monaten (+6 M) wurde sowohl in der Flavanol- als auch in der Placebo-Gruppe untersucht. In der Flavanol-Gruppe zeigte sich am Kontrollarm nach einwöchiger Flavanol-Supplementierung ein signifikanter Anstieg der FMD. Weitere signifikante Änderungen wurden nicht verzeichnet. Sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,000$) als auch die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,007$) haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der FMD. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

3.4 Einfluss von Kakaoflavanolen auf die Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung

Initial bestand zwischen den beiden Gruppen proximal der Punktionsstelle kein signifikanter Unterschied der IMT (0,36 mm, 95% KI [-0,35; 0,37] vs. 0,37 mm, 95% KI [-0,35; 0,38]). Sechs Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung zeigte sich in der Flavanol-Gruppe keine signifikante Änderung der IMT (+0,013 mm, 95% KI [-0,001; 0,026]). In der Placebo-Gruppe lag nach sechs Monaten eine signifikante Zunahme verglichen mit dem Ausgangswert vor (+0,074 mm, 95% KI [-0,061; 0,088]).

Weitere signifikante Änderungen waren nicht zu verzeichnen.

Sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,000$) als auch die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,000$) haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der IMT.

Änderung der IMT am Katheterarm

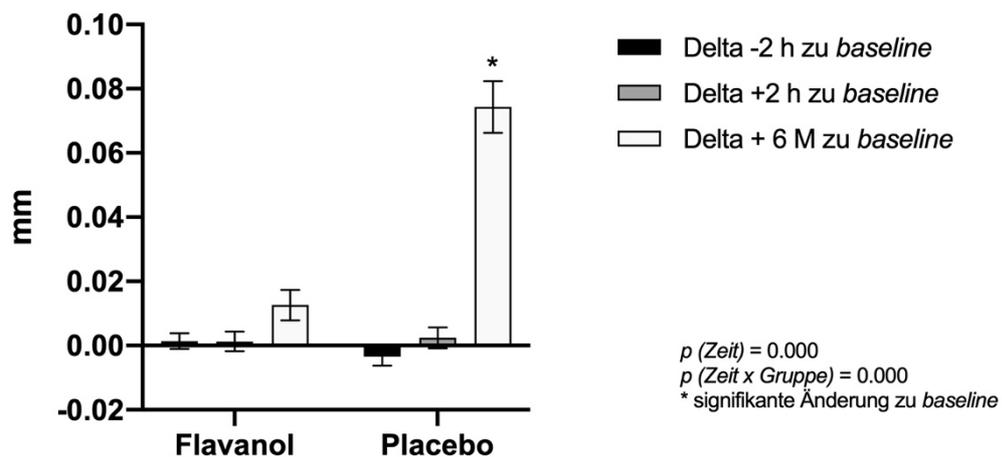


Abb. 11: Änderung (Delta) der IMT der *A. radialis* am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu *baseline* in der Flavanol-Gruppe und Placebo-Gruppe

Die Änderung der IMT zwischen Ausgangswert (*baseline*) sowie einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h), unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) und nach sechs Monaten (+6 M) wurde sowohl in der Flavanol- als auch in der Placebo-Gruppe untersucht. Nach sechs Monaten zeigt sich eine signifikante Zunahme der IMT in der Placebo-Gruppe. Sowohl die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte (p (*Zeit*) = 0,000) als auch die Kombination von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit (p (*Zeit x Gruppe*) = 0,000) haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der IMT. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

3.5 Einfluss von Kakaoflavanolen auf inneren und äußeren Gefäßdiameter:

Die inneren (1,83 mm, 95% KI [1,66; 2,01] vs. 2,02 mm, 95% KI [1,85; 2,21]) und äußeren (2,56 mm, 95% KI [2,38; 2,74] vs. 2,76 mm, 95% KI [2,58; 2,94]) Diameter unterschieden sich am Katheterarm zu Beginn der Studie nicht signifikant.

In der Placebo-Gruppe kam es unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung zu einer Zunahme von innerem (+0,22 mm, 95% KI [0,07; 0,36]) und äußerem (+0,22 mm, 95% KI [0,07; 0,37]) Diameter, während innerer (+0,12 mm, 95% KI [-0,03; 0,27]) und äußerer (+0,13 mm, 95% KI [-0,02; 0,27]) Diameter in der Flavanol-Gruppe unverändert blieben.

Zwischen den Zeitpunkten -2 h und + 6 M zeigten sich in beiden Gruppen keine weiteren signifikante Änderungen.

Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des inneren (p (*Zeit*) = 0,017) und des äußeren (p (*Zeit*) = 0,004) Diameters haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit sowohl im Falle des inneren (p (*Zeit x Gruppe*) = 0,803) als auch des äußeren (p (*Zeit x Gruppe*) = 0,572) Diameters keine statistische Signifikanz nachweisen.

Änderung des inneren Diameters

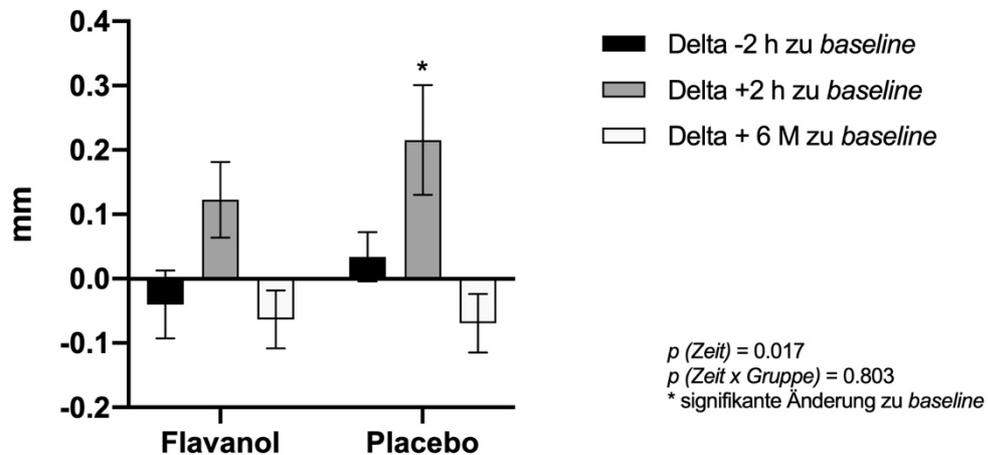


Abb. 12: Änderung (Delta) des inneren Diameters der *A. radialis* am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu *baseline*

Die Änderung des inneren Gefäßdiameters zwischen Ausgangswert (*baseline*) sowie einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h), zwei Stunden (+2 h) und sechs Monate (+6 M) nach Herzkatheteruntersuchung wurden in der Flavanol- und Placebo-Gruppe untersucht. Zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung zeigte sich eine signifikante Zunahme in der Placebo-Gruppe. Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,017$) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des inneren Diameters haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,803$) keine statistische Signifikanz nachweisen. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

Änderung des äußeren Diameters

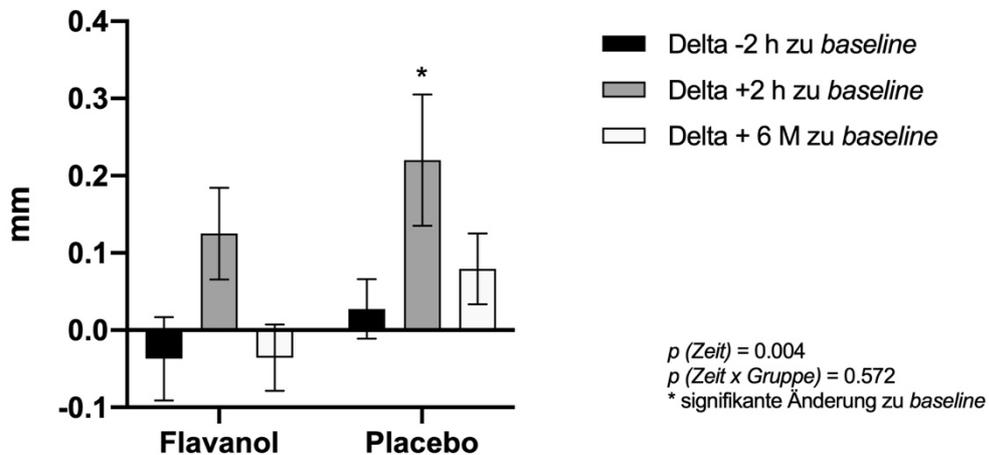


Abb. 13: Änderung (Delta) des äußeren Diameters der *A. radialis* am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu *baseline*

Die Änderung des äußeren Gefäßdiameters zwischen Ausgangswert (*baseline*) sowie einwöchiger Flavanol-Supplementierung (-2 h), unmittelbar nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) und nach sechs Monaten (+6 M) wurde sowohl in der Flavanol- als auch in der Placebo-Gruppe untersucht. Zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung zeigte sich eine signifikante Zunahme in der Placebo-Gruppe. Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,004$) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des inneren Diameters haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,572$) keine statistische Signifikanz nachweisen. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

3.6 Einfluss der Kakaoflavanole auf den Spiegel zirkulierender EMP

Untersucht wurden die Seren von je $n = 13$ Patienten in beiden Gruppen.

Die Plasmaspiegel der untersuchten EMP-Subpopulationen unterschieden sich in der Flavanol- und Placebo-Gruppe initial nicht signifikant (CD31⁺/41⁻: 607 *events/μl*, 95% KI [549; 665] vs. 595 *events/μl*, 95% KI [537; 652], CD144⁺: 749 *events/μl*,

95% KI [699; 799] vs. 713 *events/μl*, 95% KI [663; 763], CD62E⁺: 611 *events/μl*, 95% KI [569; 654] vs. 618 *events/μl*, 95% KI [575; 660]).

Zwischen Studienbeginn und einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung sanken die Spiegel aller untersuchten EMP-Subpopulationen in der Flavanol-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant (CD31⁺/41⁻: -142 *events/μl*, 95% KI [-204; -80], CD144⁺: -84 *events/μl*, 95% KI [-126; -42], CD62E⁺: -72 *events/μl*, 95% KI [-103; -41]). In der Placebo-Gruppe gab es keine signifikanten Veränderungen.

Zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung wurde in der Placebo-Gruppe ein Spiegelanstieg aller untersuchten EMP-Subpopulationen gemessen (CD31⁺/41⁻: +81 *events/μl*, 95% KI [48; 114], CD144⁺: +89 *events/μl*, 95% KI [48; 130], CD62E⁺: +69 *events/μl*, 95% KI [14; 125]). In der Flavanol-Gruppe war kein signifikanter Unterschied verglichen zum Ausgangswert zu verzeichnen.

Während die Untersuchungszeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Plasmaspiegel haben, zeigt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit keine statistische Signifikanz.

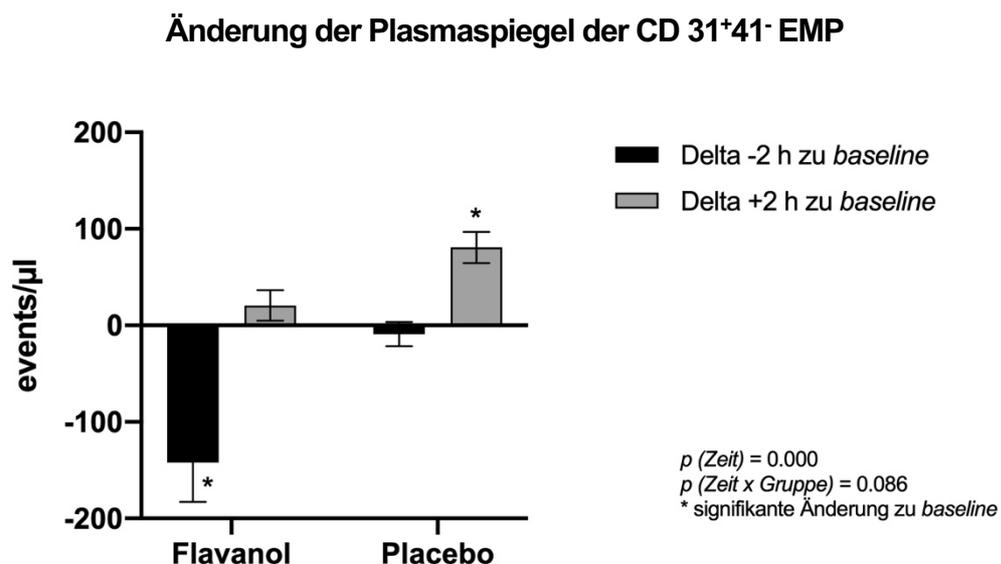


Abb. 14: Änderung (Delta) der CD31⁺41⁻ EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu *baseline*

In der Flavanol-Gruppe ist nach einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung (-2 h) ein signifikanter Abfall der CD31⁺41⁻EMP zu verzeichnen. Der in der Placebo-Gruppe zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) dokumentierte signifikante Anstieg bleibt in der Flavanol-Gruppe aus. Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte (p (Zeit) = 0,000) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Plasmaspiegels haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit (p (Zeit x Gruppe) = 0,086) keine statistische Signifikanz nachweisen. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

Änderung der Plasmaspiegel der CD144⁺ EMP

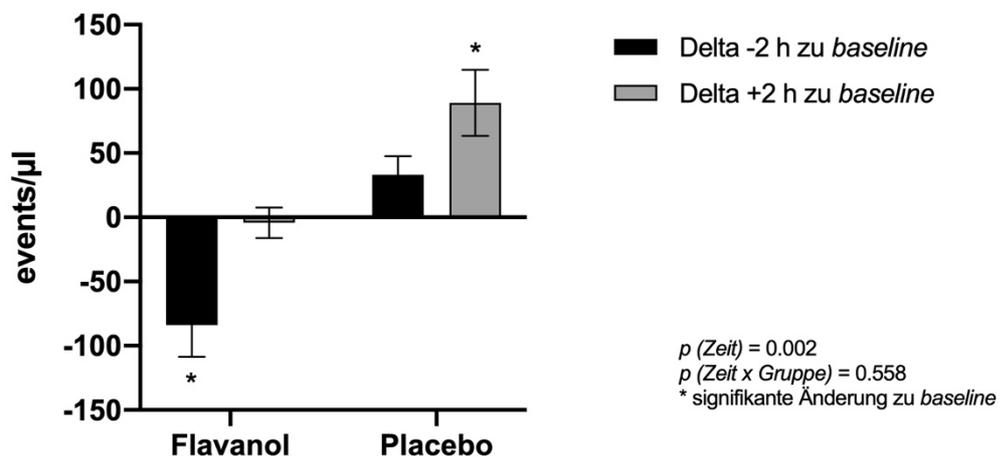


Abb. 15: Änderung (Delta) der CD144⁺ EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M und *baseline*

In der Flavanol-Gruppe ist nach einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung (-2 h) ein signifikanter Abfall der CD144⁺EMP zu verzeichnen. Der in der Placebo-Gruppe zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) dokumentierte signifikante Anstieg bleibt in der Flavanol-Gruppe aus. Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte (p (Zeit) = 0,002) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Plasmaspiegels haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit (p (Zeit x Gruppe) = 0,558) keine statistische Signifikanz nachweisen. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikante Änderung zu *baseline*.

Änderung der Plasmaspiegel der CD62E⁺ EMP

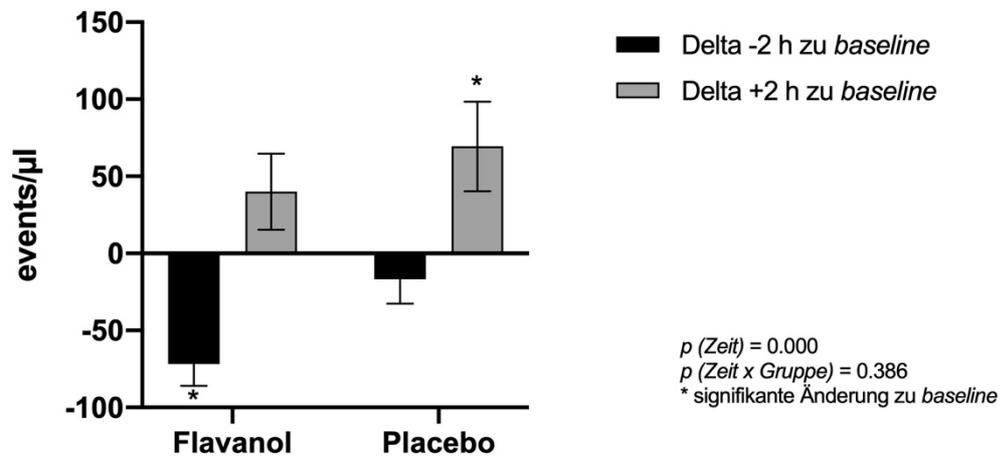


Abb. 16: Änderung (Delta) der CD62E⁺ EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu *baseline*

In der Flavanol-Gruppe ist nach einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung (-2 h) ein signifikanter Abfall der CD62E⁺EMP zu verzeichnen. Der in der Placebo-Gruppe zwei Stunden nach Herzkatheteruntersuchung (+2 h) dokumentierte signifikante Anstieg bleibt in der Flavanol-Gruppe aus. Während die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte ($p(\text{Zeit}) = 0,000$) einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Plasmaspiegels haben, lässt sich für die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit ($p(\text{Zeit} \times \text{Gruppe}) = 0,386$) keine statistische Signifikanz nachweisen. Angegeben werden Mittelwert und Standardfehler, * bedeutet signifikant zu *baseline*.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine randomisierte, placebokontrollierte und doppelt verblindete diätetische Interventionsstudie im Parallelgruppendesign durchgeführt, um den Einfluss von Kakaoflavanolen auf die kurz- und langfristige Gefäßantwort nach Endothelverletzung infolge einer transradialen Herzkatheteruntersuchung zu erfassen.

Insgesamt durchliefen sowohl in der Flavanol- als auch in der Placebo-Gruppe 16 Patienten die Studie vollständig. Die Bestimmung der FMD und der IMT erfolgte bei Aufnahme in die Studie (*baseline*), nach einwöchiger diätetischer Intervention unmittelbar vor (-2 h) und zwei Stunden nach (+2 h) transradialer Herzkatheteruntersuchung sowie abschließend nach sechs Monaten (+6 M). Die diätetische Intervention wurde nach der transradialen Herzkatheteruntersuchung für eine weitere Woche fortgeführt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine einwöchige Kakaoflavanol-Supplementierung zu einer signifikant verbesserten Endothelfunktion führt. Auf zellulärer Ebene spiegelt sich dies in einer Reduktion der EMP-Plasmaspiegel wider.

Die nach transradialer Herzkatheteruntersuchung in der Placebo-Gruppe beobachtete transiente Ektasie der *A. radialis* sowie der Anstieg der EMP-Plasmaspiegel wurden in der Flavanol-Gruppe nicht dokumentiert. Anhand der vorliegenden Fallzahl ist der Einfluss der Flavanole auf die beiden letztgenannten Beobachtungen nicht sicher zu belegen.

Langfristig verhindert die Supplementierung von Kakaoflavanolen die durch transradiale Herzkatheteruntersuchung hervorgerufene persistierende Verschlechterung der Endothelfunktion, gemessen als FMD, sowie eine Intima-Media-Hyperplasie, wie sie in der Kontrollgruppe zu beobachten sind.

4.1 Einordnung der eigenen Methoden in die Literatur

Die Bestimmung der FMD ist eine anerkannte Methode zur nicht-invasiven Quantifizierung der Endothelfunktion größerer arterieller Gefäße (44–48).

Die Messergebnisse hängen deutlich von den Messbedingungen, Vorbereitung der Patienten und dem Training des Untersuchers ab (53). Unser Studienprotokoll (vgl. Kapitel 2) befolgt die Empfehlungen für die Standardisierung der FMD-Messung (44–46) mit Ausnahme einiger studiendesign-bedingter Limitationen (Messung zu unterschiedlichen Tageszeiten und fehlende Nahrungskarenz zum Zeitpunkt +2 h), die beide Gruppen gleichermaßen betrafen.

Auch wenn ein Großteil der Literatur sich auf die *A. brachialis* bezieht, ist die FMD-Methode für die Bestimmung der Gefäßfunktion der *A. radialis* gut durchführbar und geeignet. Die zu erwartenden Werte liegen etwas höher als bei der *A. brachialis*. Die Okklusion am Unterarm führt bei der *A. radialis* zu höheren Werten als die am Oberarm, bei der *A. brachialis* verhält es sich gegenteilig. (106)

Daher sind FMD-Werte zwischen verschiedenen Studien *per se* nicht vergleichbar. Sansone *et al.* bestimmten die FMD der *A. radialis* ebenfalls nach Unterarm-Okklusion. Der mittlere FMD-Wert ihrer Kontrollgruppe lag mit $9,1 \pm 1,3$ % in einem ähnlichen Bereich wie unsere Werte. Auch der Abfall auf $4,7 \pm 1,2$ % unmittelbar nach transradialer Herzkatheteruntersuchung hat die gleiche Größenordnung wie der Abfall in unserer Placebo-Gruppe. (58)

Die von uns durchgeführte IMT-Messung der *A. radialis* mittels hochauflösendem Ultraschall (13 MHz) ist eine gut durchführbare Methode mit hoher Reliabilität und Reproduzierbarkeit, durch die langfristige Änderungen der IMT evaluiert werden können (10). In dieser Querschnittsstudie von Stegemann *et al.* wurde ebenfalls die Auswirkung von transradialer Herzkatheteruntersuchung auf die IMT untersucht, in dem die IMT des Katheterarms ($0,41 \pm 0,055$ mm) mit der IMT des kontralateralen Arms ($0,3 \pm 0,056$ mm) ein bis zwölf Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung verglichen wurde. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Katheterarm und dem Kontrollarm.

Eine Stärke unserer Studie ist, dass wir die IMT am Katheterarm nicht nur sechs Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung maßen, sondern einen Ausgangswert vor Endothelverletzung bestimmten. So konnten wir ausschließen, dass die beobachtete IMT-Änderung durch eine vorbestehende Seitendifferenz der verfälscht wurde. Die Studienpatienten wurden in unserer Studie sechs Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung zur Kontrolluntersuchung einbestellt, um eine gute Vergleichbarkeit der IMT-Änderung zu gewährleisten.

4.2 Einfluss des transradialen Zugangsweges auf Integrität, Struktur und Funktionalität des Endothels

Unsere Arbeit zeigt, dass es durch transradiale Herzkatheteruntersuchung sowohl kurz- als auch langfristig zu einem signifikanten Abfall der Endothelfunktion, gemessen als FMD, kommt. Somit konnten wir den in der Literatur beschriebenen Abfall der FMD nach mechanischer Endothelverletzung durch transradiale Herzkatheteruntersuchung reproduzieren (11,12,57,107,108).

Mechanistisch legen diese Studienergebnisse nahe, dass es im Rahmen der transradialen Herzkatheteruntersuchung zu einer Freilegung des Endothels sowie der darunterliegenden glatten Muskelzellen kommt. In der Folge sinkt die NO-Bioverfügbarkeit, sodass es als Antwort auf eine erhöhte Wandscherspannung nur noch zu einer deutlich eingeschränkten Vasodilatation kommt. Es ist anzunehmen, dass auf Grund der mechanischen Endothelverletzungen auch andere vasoprotektive Wirkungen von NO kompromittiert sind. NO inhibiert die Aggregation von Thrombozyten, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen sowie die Adhäsion und Penetration von Makrophagen (36) und hat somit eine antiinflammatorische Wirkung. Zudem trägt NO über Freisetzung, Chemotaxis und Beeinflussung der Funktionalität von CAC zur endothelialen Regeneration nach mechanischer Schädigung bei (34), (41).

Die von uns beobachtete langfristige Verschlechterung der Endothelfunktion nach mechanischer Schädigung wird von mehreren Quellen bestätigt (109,110). Jedoch herrscht in der Literatur diesbezüglich Uneinigkeit. In anderen vergleichbaren Studien wurde keine langfristige Beeinträchtigung der FMD dokumentiert (57,107,108,111). Diese divergierenden Ergebnisse können möglicherweise Ausdruck der klinischen und periprozeduralen Charakteristika sein, die die FMD beeinflussen und sich zwischen den Studienpopulationen der Literatur unterscheiden. Während die Anwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren die FMD verschlechtert, verbessern Interventionen zur Risikoreduktion die FMD (55).

Änderungen des kardiovaskulären Risikoprofils nach Herzkatheteruntersuchung, wie eine Nikotinkarenz oder eine neu begonnene Therapie mit blutdruck- oder cholesterinsenkender Medikation können die Entwicklung der FMD beeinflussen. Heiss *et al.* fanden einen Zusammenhang zwischen Nikotinkonsum und verzögerter Regeneration der Endothelfunktion sowie eine negative Korrelation der Anzahl verwendeter Katheter zur Regeneration (57). Sansone *et al.* zeigten, dass sich die FMD nach Herzkatheteruntersuchung bei Rauchern wegen Beeinträchtigung der eNOS langsamer erholt als bei ehemaligen Rauchern (12). Das kardiovaskuläre Risikoprofil wurde in unserer Studie zu Beginn, nicht jedoch nach sechs Monaten erfasst, so dass wir hierzu keine Aussage treffen können.

Nichtsdestotrotz erachten wir eine langfristige Reduktion der Endothelfunktion als plausibel, da in unserer Studie die mechanische Endothelverletzung nicht nur die Funktionalität des Endothels kompromittiert, sondern auch zu einer messbaren strukturellen Änderung der Gefäßwand führt. So beobachteten wir im Rahmen der transradialen Herzkatheteruntersuchung in der Placebo-Gruppe sechs Monate später eine Intima-Media-Hyperplasie. Die von uns beobachtete Assoziation von katheterassoziierter Endothelverletzung und Intima-Media-Hyperplasie wird von anderen transkutanen (10–12) und intravaskulären (13) Ultraschalluntersuchungen sowie durch eine histologische Studie (14) bestätigt. Bewirkt wird die Hyperplasie nach Endothelverletzung durch einen mehrschrittigen, Wochen bis Monate andauernden Prozess, der in der Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima mit anschließender Proliferation und gesteigerter Produktion extrazellulärer Matrix mündet (20).

In unserer Studie wurde postprozedural in der Placebo-Gruppe eine kurzfristige, nach sechs Monaten reversible Ektasie der punktierten *A. radialis*, gemessen als Zunahme von innerem und äußerem Diameter, dokumentiert. Dieses Ergebnis wird von verschiedenen Studien geteilt (57,107,109). Ellen *et al.* postulieren als Erklärung eine Abtragung des Endothels, ohne die IMT sonographisch direkt untersucht zu haben.

Pathomechanistisch gehen wir ebenfalls von einer mechanischen Schädigung des Endothels aus, können eine vollständige Abtragung jedoch ausschließen, da wir zu jedem Zeitpunkt das Vorhandensein einer Intima-Media-Schicht sonographisch nachweisen konnten.

Burstein *et al.* erklären die postprozedurale Diameterzunahme durch eine Dehnung des Gefäßes infolge der Insertion einer 6 F Schleuse, deren Außendiameter im Durchschnitt größer als der Innendiameter der *A. radialis* war. In ihrer Studie war nicht nur die flussmedierte Vasodilatation nach transradialer Herzkatheteruntersuchung als Ausdruck der gestörten Endothelfunktion kompromittiert, sondern auch die Vasodilatation als Antwort auf die exogene Zufuhr von Nitroglycerin. Dies werteten Burstein *et al.* als Beweis für eine direkte Schädigung der glatten Gefäßmuskulatur. Sie sehen die nach transradialer Herzkatheteruntersuchung reduzierte Vasodilatation also sowohl funktionell als auch strukturell bedingt an.

Wir teilen letzteren Erklärungsansatz für die Ergebnisse unserer Studie. In unserem Fall kann zwar kein direkter Schluss auf die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur gezogen werden, da wir aus Patientensicherheitsgründen auf die Applikation von Nitroglycerin verzichteten. Jedoch liegt auch in der Gesamtpopulation unserer Studie der Innendurchmesser mit durchschnittlich 1,93 mm unter dem Außendurchmesser der bei allen Patienten einheitlich verwendeten 6 F Schleusen. Zudem konnten wir die von Burstein *et al.* beobachtete postprozedural beobachtete Diameterzunahme im Sinne einer iatrogenen Ektasie reproduzieren, sodass wir ebenfalls von einer gemischt strukturellen und funktionellen Genese der reduzierten Vasodilatation ausgehen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die eine langfristige katheterassoziierte Lumenreduktion attestieren (11,13,58,110,111). In unserer Studie konnte diese Beobachtung als Trend abgebildet werden. Ein von uns bei Planung der Studie vermuteter *Remodeling*-Prozess mit Zunahme des äußeren Diameters oder Abnahme des inneren Diameters zeichnete sich ebenfalls nur trendweise ab.

Eine vollständige Okklusion der *A. radialis* nach transradialer Herzkatheteruntersuchung wurde in unserer Studie nicht beobachtet. Damit weichen wir deutlich von der in der *ARTEMIS*-Studie durch eine Metaanalyse von 112 Studien ermittelten Gesamt-Okklusionsrate von 5,2 % ab (8).

In der *ARTEMIS*-Studie wurden Studien mit verschiedenen Protokollen im Rahmen der transradialen Herzkatheteruntersuchung berücksichtigt. Es zeigte sich, dass eine *low-dose* Heparin-gabe bei transradialer Herzkatheteruntersuchung mit einer höheren Verschlussrate assoziiert ist als eine *high-dose* Heparin-gabe (> 50 I.E. / kg). Die Dauer der Kompression (< 4 h vs. > 4 h) scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Okklusionsrate zu haben (112).

Wir postulieren daher, dass die konsequente *high-dose* Heparin-gabe während der transradialen Herzkatheteruntersuchung und die Entlastung des TR-Bandes® im 15-minütigen Intervall mit vollständiger Entlastung nach zwei Stunden in unserem Studienprotokoll das Risiko für radiale Okklusionen drastisch reduzieren.

4.3 Einfluss der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung auf Integrität, Struktur und Funktionalität des Endothels

4.3.1 Kakaoflavane verbessern kurzfristig die Endothelfunktion und verhindern eine langfristige Verschlechterung der Endothelfunktion nach mechanischer Endothelverletzung

Unsere Daten zeigen, dass es nach einwöchiger Kakaoflavanol-Supplementierung zu einer Verbesserung der Endothelfunktion, gemessen als FMD, kommt. Es zeichnet sich zudem der Trend ab, dass durch die Kakaoflavanol-Supplementierung der Abfall der FMD nach mechanischer Endothelverletzung geringer ausfällt als in der Placebo-Gruppe. In der Flavanol-Gruppe erholte sich die Endothelfunktion nach sechs Monaten vollständig, während die FMD in der Placebo-Gruppe langfristig signifikant reduziert blieb.

Die beobachtete Steigerung der FMD nach Kakaoflavanol-Supplementierung deckt sich mit Ergebnissen in der Literatur (87,88,113). Der Einfluss von Kakaoflavanolen auf die Endothelfunktion nach transradialer Herzkatheteruntersuchung wurde bislang noch nicht untersucht.

Schroeter *et al.* wiesen nach, dass die im Rahmen einer Kakaoflavanol-Supplementierung gesteigerte FMD Korrelat einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit ist (86). Kakaoflavanole sorgen durch Inhibition der endothelialen NADPH-Oxidase für eine verminderte NO-Inaktivierung durch freie Radikale.

Langfristig wirken Kakaoflavanole wahrscheinlich über eine erhöhte eNOS-Expression. Da in der vorliegenden Arbeit die FMD nach transradialer Herzkatheteruntersuchung in der Flavanol-Gruppe trendweise weniger absank als in der Kontrollgruppe, nehmen wir mechanistisch an, dass die gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit während der Kakaoflavanol-Supplementierung die durch Endothelverletzung verursachte endotheliale Dysfunktion teilweise ausgleicht.

In einer 2017 veröffentlichten Studie zeigten Fan *et al.*, dass die periinterventionelle Einnahme des Kalium-Kanal-Öffners Nicorandil zu einer besseren Regeneration der Endothelfunktion nach drei Monaten führt (114). Auch sie führen als mögliche Mechanismen eine vermehrte eNOS-Aktivierung und eine Reduktion freier Radikale mit gesteigerter NO-Bioverfügbarkeit auf.

Unsere Daten zeigen ebenfalls unter Kakaoflavanol-Supplementierung eine vollständige Regeneration der Endothelfunktion sechs Monate nach mechanischer Endothelverletzung. In der Placebo-Gruppe bleibt die FMD verglichen mit dem Ausgangswert auch sechs Monate nach transradialer Herzkatheteruntersuchung signifikant reduziert.

Zwischen lokaler endothelialer Dysfunktion und vermehrter Intima-Media-Hyperplasie besteht eine enge Assoziation (61). Daher werten wir die in der Flavanol-Gruppe nach transradialer Herzkatheteruntersuchung langfristig nicht beeinträchtigte Endothelfunktion als wichtigen Baustein zu einer langfristigen Verhinderung von Intima-Media-Hyperplasie.

4.3.2 Kakaoflavanole verhindern langfristig Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung

Unsere Ergebnisse belegen, dass eine zweiwöchige periinterventionelle Kakaoflavanol-Supplementierung die katheterassoziierte Intima-Media-Hyperplasie nach sechs Monaten verhindert, während in der Placebo-Gruppe eine Zunahme der IMT zu beobachten war.

Der Zusammenhang von Kakaoflavanol-Supplementierung und Verhinderung von Intima-Media-Hyperplasie nach mechanischer Endothelverletzung durch transradiale Herzkatheteruntersuchung wurde von uns erstmalig beschrieben. Wie im vorgehenden Abschnitt beschrieben, geht diese ausbleibende strukturelle Veränderung der Gefäßwand nach mechanischer Endothelverletzung mit einer langfristig erhaltenen Endothelfunktion einher.

Endothelverletzungen führen über mehrschrittige, Wochen bis Monate andauernde Prozesse zu einer Intima-Media-Hyperplasie. Durch Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima mit anschließender Proliferation kommt es zu einer gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrix (20). Reendothelialisierung wirkt durch Wiederherstellung der Integrität und Funktionalität des Endothels entscheidend der Intima-Media-Hyperplasie und weiteren atherosklerotischen Prozessen entgegen.

Wir erklären die ausbleibende Intima-Media-Hyperplasie nach periinterventioneller Kakaoflavanol-Supplementierung mit der Unterstützung endogener Reparaturmechanismen und der gehemmten Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen, maßgeblich gefördert durch gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit. Die nach Kakaoflavanol-Supplementierung gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit konnten wir, wie zuvor diskutiert, über die Steigerung der FMD belegen.

In der Literatur wird der von uns beobachtete Zusammenhang von NO-Bioverfügbarkeit und Reendothelialisierung durch verschiedene Studien bestätigt: Die Beeinträchtigung der eNOS-Funktion durch Rauchen führt zu einer

vermehrten Intima-Media-Hyperplasie nach katheterassoziierter Endothelverletzung (58).

Im Tiermodell führte die periinterventionelle Supplementierung des Polyphenols Resveratrol zu einer geringeren Intima-Media-Hyperplasie mit verringerter Zahl der glatten Muskelzellen (119). Khandelwal *et al.* wiesen im Rahmen dessen nach, dass es durch Resveratrol zu einem Anstieg von NO kommt, durch den wiederum die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen inhibiert wird. In einem weiteren Experiment demonstrierte die Arbeitsgruppe, dass die Supplementierung von Resveratrol bei Mäusen die Intima-Media-Hyperplasie nach Endothelverletzung deutlich mindert, dieser Effekt aber bei gleichzeitiger Supplementierung des unselektiven eNOS-Inhibitors NG-Nitro-L-Arginine-Methylester (L-NAME) ausbleibt. (120)

Neben der Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen über gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit scheinen Kakaoflavanoole auch über die vermehrte Mobilisation von zirkulierenden angiogenetischen Zellen (CAC) zu einer physiologischen Endothelregeneration beizutragen. Im Rahmen der Reendothelialisierung werden CAC aus dem Knochenmark mobilisiert (40), die zu Orten mit Endothelverletzung wandern. Dort vermitteln sie über Ausschüttung verschiedener Faktoren wie VEGF, SFD-1 α , MCP-1 und NO Angiogenese und die Reparatur endothelialer Defekte, ohne selbst in reife Endothelzellen zu differenzieren (34,41).

Der eNOS wird bei der Endothelregeneration eine Schlüsselfunktion zugeschrieben, da sie für die Freisetzung der CAC aus dem Knochenmark sowie deren weitere Chemotaxis und Funktionalität wichtig zu sein scheint (34). Kakaoflavanoole verstärken die Aktivität der eNOS durch Reduktion des oxidativen Stresses und durch Steigerung der eNOS-Expression. Heiss *et al.* zeigten, dass die Verbesserung der FMD als Korrelat erhöhter NO-Bioverfügbarkeit im Rahmen einer Kakaoflavanol-Supplementierung mit einem Anstieg der CAC assoziiert ist (91).

Der Zusammenhang von therapeutisch gesteigerter CAC-Zahl und verringerter Intima-Media-Hyperplasie ist in der Literatur beschrieben. Im Tiermodell steigern Östrogene (121) und Statine (122) die Zahl der CAC und führen zu verminderter

Neointima-Bildung. Auch wenn die Mechanismen nicht abschließend aufgedeckt sind, scheint in beiden Fällen eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit an der Steigerung der CAC-Level beteiligt zu sein (121). Laufs *et al.* zeigten, dass durch körperliche Aktivität die Neointimaformation nach Endothelverletzung verringert wird und es zu einer Steigerung der CAC-Spiegel kommt, die mindestens in Teilen NO und VEGF abhängig ist (123).

Mechanistisch sehen wir also neben der gehemmten Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen die Steigerung der CAC-Spiegel als Erklärung für die infolge von Kakaoflavanol-Supplementierung verhinderte Intima-Media-Hyperplasie nach Endothelverletzung an.

4.3.3 Einfluss von Kakaoflavanolen auf die Änderung von inneren und äußeren Diameter sowie langfristiges *Remodeling* nicht belegbar

Während in der Placebo-Gruppe eine postprozedurale reversible Ektasie - gemessen als Zunahme von innerem und äußerem Gefäßdiameter - dokumentiert wurde, ist diese in der Flavanol-Gruppe nicht zu beobachten. Der Einfluss der periinterventionellen Supplementierung von Kakaoflavanolen auf diesen Sachverhalt kann jedoch nicht belastbar beurteilt werden, da die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt mit Gruppenzugehörigkeit statistisch nicht signifikant war und eine *post hoc* Power-Analyse (*power* innerer Diameter: 0,26; *power* äußerer Diameter 0,13) eine deutlich zu kleine Fallzahl für die Beantwortung der Frage nach diesem tertiären Endpunkt attestierte.

In keiner der beiden Gruppen wurde eine signifikante langfristige Änderung von innerem und äußerem Gefäßdiameter beobachtet. Den erwarteten Einfluss auf das *Remodeling* konnten wir dementsprechend nicht nachweisen.

Der einschlägigen Literatur zufolge ist die radiale Okklusion nach transradialer Herzkatheteruntersuchung eine häufige Komplikation. Die *ARTEMIS* – Studie ermittelte durch eine Metaanalyse von 112 Studien eine Gesamt-Okklusionsrate von 5,2 %. (8)

In unserer Studie kam es in keinem Fall zu einer radialen Okklusion nach transradialer Herzkatheteruntersuchung. Wir können dieses Ergebnis nicht sicher der protektiven Wirkung der Kakaoflavanole zuschreiben, da es auch in der Kontrollgruppe keinen Verschluss gab. Die *ARTEMIS* – Studie zeigte, dass eine *low-dose* Heparin-gabe bei Herzkatheteruntersuchung mit einer höheren Verschlussrate assoziiert ist als eine *high-dose* Heparin-gabe (> 50 I.E. / kg). Auch die Dauer der Kompression (< 4 h vs. > 4 h) scheint einen Einfluss auf die Okklusionsrate zu haben (112). Wahrscheinlich tragen, wie bereits zuvor diskutiert, die routinemäßige *high-dose* Heparin-gabe während der transradialen Herzkatheteruntersuchung und die sukzessive (alle 15 min) Entlastung des TR-Bandes® mit vollständiger Entlastung nach spätestens zwei Stunden zu den fehlenden Verschlüssen unserer Studienpatienten bei.

4.4 Einfluss der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung auf endotheliale Mikropartikel als Surrogatparameter und Modifikator der Endothelfunktion nach mechanischer Verletzung

Die vermehrte Freisetzung endothelialer Mikropartikel (EMP) durch katheterinduzierte mechanische Endothelschädigung wurde erstmals von Sansone *et al.* beschrieben. Der beobachtete frühe (ein bis vier Stunden nach Herzkatheteruntersuchung) Anstieg der CD144⁺EMP wird als Korrelat der apoptotischen Komponente nach mechanischer Endothelverletzung bewertet, während der späte (vier bis 24 Stunden nach Herzkatheteruntersuchung) Anstieg der CD62E⁺EMP als Korrelat der einsetzenden Zellaktivierung im Sinne der „*response-to-injury*“ anzusehen ist. (69)

Unsere Arbeit bestätigt diese Ergebnisse. In der Placebo-Gruppe findet sich für alle Subpopulationen ein signifikanter Anstieg der EMP-Plasmaspiegel zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach transradialer Herzkatheteruntersuchung.

Horn *et al.* stellten fest, dass es nach dreißigtägiger Kakaoflavanol-Supplementierung zu einem Abfall der EMP-Spiegel kommt. Gleichzeitig korrelierten die Spiegel invers mit der FMD (124).

Unsere Daten bestätigen diese Beobachtungen. Es ist denkbar, dass die verringerten EMP-Spiegel Folge der geringeren Apoptoserate und Aktivierung endothelialer Zellen nach Besserung der Endothelfunktion durch Kakaoflavanol-Supplementierung sind (124). Der exakte Mechanismus der EMP-Freisetzung konnte *in vivo* bislang jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zudem zeigen unsere Daten, dass in der Flavanol-Gruppe der Anstieg der Plasmaspiegel der untersuchten EMP-Subpopulationen nach mechanischer Endothelverletzung ausbleibt. Der Einfluss der periinterventionellen Supplementierung von Kakaoflavanolen auf diesen Sachverhalt kann jedoch nicht belastbar beurteilt werden, da die Wechselwirkung von Untersuchungszeitpunkt mit Gruppenzugehörigkeit statistisch nicht signifikant war und eine *post hoc* Power-Analyse eine deutlich zu kleine Fallzahl (*power* CD31⁺41⁻ EMP: 0,37, *power* CD144⁺ EMP: 0,12, *power* CD62E⁺ EMP: 0,18) für die Beantwortung der Frage nach diesem tertiären Endpunkt attestierte.

Der Zusammenhang von periinterventioneller Kakaoflavanol-Supplementierung und EMP-Plasmaspiegel wurde in der Literatur bislang nicht untersucht.

In Zusammenschau mit der im vorherigen Abschnitt zitierten Arbeit von Horn *et al.* und dem von uns beobachteten trendweise geringeren Abfall der FMD in der Flavanol-Gruppe werten wir die EMP daher als möglichen Surrogat-Parameter für die protektive Wirkung der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung, auch wenn diese Aussage mit der untersuchten Fallzahl nicht belastbar ist.

Neben ihrer Charakterisierung als Marker für Apoptose und Zellaktivierung wurde nachgewiesen, dass EMP aktiv die Endothelfunktion beeinträchtigen. *In vivo* generierte Mikropartikel, die im Blut von Patienten mit akutem Koronarsyndrom, metabolischem Syndrom oder chronischem Nierenversagen zirkulierten, führten bei

Aortenringen von Ratten nach Inkubation zu endothelialer Dysfunktion (66). Über verschiedene Mechanismen hemmen EMP die eNOS (66,68). EMP tragen durch Förderung eines prothrombotischen und inflammatorischen Zustandes über verschiedene Mechanismen zur Ausprägung eines proatherogenen Phänotyp der Endothelzellen bei, unter anderem durch verminderte Bioverfügbarkeit von NO und durch Förderung der Sekretion der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8 (75). Daher ist es möglich, dass die in Folge der Kakaoflavanol-Supplementierung gesenkten EMP-Spiegel zusätzlich zur direkten Wirkung der Kakaoflavane zur Verbesserung und umgekehrt die nach mechanischer Endothelverletzung freigesetzten EMP zur Verschlechterung der Endothelfunktion, gemessen als FMD, beitragen.

4.5 Limitationen der Studie

Für diese Studie ergeben sich mehrere Limitationen. Es handelt sich um eine *Single-Center*-Studie mit relativ kleiner Fallzahl. Die in der *a priori* – *Power*-Analyse geplante Stichprobengröße von $n = 18$ pro Gruppe, die auf Basis früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, konnte für die angiologischen Untersuchungen eingehalten werden. Der primäre und sekundäre Endpunkt zeigten eine klare statistische Signifikanz der erwarteten Wechselwirkung von Gruppenzugehörigkeit und Untersuchungszeitpunkt. Für ergänzende Fragestellungen erwies sich in einer *post hoc* durchgeführten *Power*-Analyse die Fallzahl jedoch als zu klein.

Die FMD kann durch verschiedene Medikamente beeinflusst werden (53). Da die Medikamenteneinnahme für die Studie nicht pausiert wurden, ist eine Beeinflussung der Messergebnisse möglich.

Vor Beginn der Kakaoflavanol-Supplementierung wurde keine Ernährungsanamnese erhoben. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Ernährungsgewohnheiten der Studienpatienten einen Einfluss auf die FMD hatten. In der Literatur finden sich Hinweise, dass das Ausmaß der Intima-Media-Hyperplasie nach Endothelverletzung ebenfalls durch Medikamente wie Statine (122), Hormone wie Östrogen (121), Nikotinkonsum (58) und Polyphenole (119), deren Zufuhr durch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten interindividuell möglicherweise differiert, moduliert werden kann. Der Einfluss dieser Variablen wurde nicht gesondert untersucht und kann daher nicht beurteilt werden.

Die Patienten führten die Kakaoflavanol-Supplementierung im ambulanten Setting durch. Die Compliance wurde mittels Aussage der Patienten, nicht aber mit Untersuchung des Urins auf Flavanol-Metabolite überprüft.

Um oben genannte bekannte sowie unbekannte personengebundenen Störgrößen auf beide Gruppen möglichst gleich zu verteilen, wurde zu Beginn der Studie dementsprechend eine Randomisierung vorgenommen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser randomisierten, placebokontrollierten und doppelblinden Studie im Parallelgruppendesign wurde zum ersten Mal der Einfluss von Kakaoflavanolen auf die kurz- und langfristige Gefäßantwort nach Endothelverletzung infolge von transradialer Herzkatheteruntersuchung analysiert.

Unsere Daten zeigen, dass Kakaoflavanole eine verletzungsassoziierte Intima-Media-Hyperplasie verhindern. Kakaoflavanole beugen außerdem einer langfristigen endothelialen Dysfunktion nach transradialer Herzkatheteruntersuchung vor. Auf zellulärer Ebene spiegelte sich die durch Flavanol-Supplementierung verbesserte Endothelfunktion durch einen Abfall der EMP-Plasmaspiegel wider. Der in der Placebo-Gruppe postprozedural beobachtete Anstieg der EMP-Plasmaspiegel als Marker für Endothelverletzung blieb in der Flavanol-Gruppe aus. Der Effekt der Flavanole ist jedoch aufgrund einer für diese Fragestellung zu geringen Fallzahl statistisch nicht belastbar.

Der transradiale Zugangsweg hat für die Koronarangiographie einen hohen Stellenwert. Trotz vieler Vorteile können katheterassoziierte kurz- und langfristige Veränderungen der *A. radialis* wie endotheliale Dysfunktion, Intima-Media-Hyperplasie und Lumenreduktion zu Komplikationen mit klinischer Relevanz führen: Nach wie vor sind radiale Okklusionen ein präsent Problem. Außerdem wird nach stattgehabter transradialer Koronarangiographie wegen möglicher persistierender Endothelschädigung und -dysfunktion von einer Verwendung der *A. radialis* als Bypass abgeraten. Auch für die Verwendung der *A. radialis* als arterio-venöser Shunt kann eine vorherige transradiale Herzkatheteruntersuchung nachteilig sein, da die IMT positiv mit frühem Shuntversagen korreliert.

Wir sehen in der periinterventionellen Kakaoflavanol-Supplementierung eine Möglichkeit, katheterassoziierte funktionelle und strukturelle Schäden der *A. radialis* zu reduzieren. Es werden weitere Studien benötigt, um unsere Ergebnisse zu bestätigen und Vorteile durch periinterventionelle Supplementierung von Kakaoflavanolen für die weitere Verwendung der *A. radialis* als Shunt oder Bypass zu belegen.

4.7 Graphical Abstract

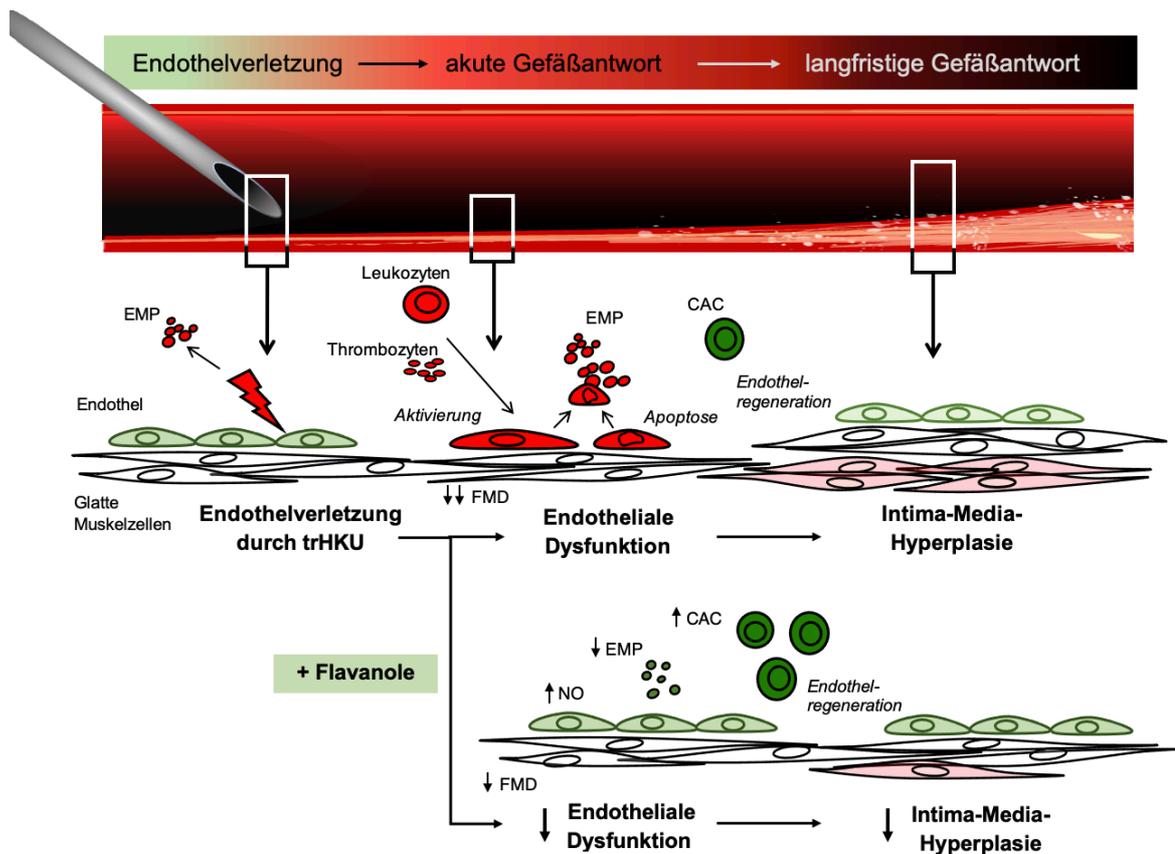


Abb. 17: Graphical abstract

In dieser placebokontrollierten Parallelgruppenstudie wird der Einfluss von Kakaoflavanolen auf die kurz- und langfristige Gefäßantwort nach Endothelverletzung infolge einer transradialen Herzkatheteruntersuchung untersucht. Durch die mechanische Endothelverletzung selbst werden endotheliale Mikropartikel (EMP) freigesetzt. In der akuten Phase nimmt das Endothel nach der Verletzung einen prothrombotischen und proinflammatorischen Phänotypen an. Aufgrund von Zellaktivierung und -Apoptose werden vermehrt EMP freigesetzt. Die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) ist wegen der verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) deutlich reduziert. Zusammenfassend wird dieser Zustand als endotheliale Dysfunktion beschrieben. Unter Vermittlung von zirkulierende angiogenetischen Zellen (CAC) findet die Endothelregeneration statt. Langfristige Folge der endothelialen Dysfunktion ist die Intima-Media-Hyperplasie durch Anreicherung extrazellulären Kollagens und einer Zunahme glatter Muskelzellen.

Infolge der periinterventionellen Flavanol-Supplementierung kommt es zu einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von NO. Dadurch wird der Zustand der endothelialen Dysfunktion nach mechanischer Endothelverletzung abgemildert. Durch verminderte Aktivierung und Apoptose der Endothelzellen sind weniger EMP nachweisbar. Die FMD fällt weniger stark ab. Die Endothelregeneration wird durch gesteigerte Verfügbarkeit von CAC gefördert. Langfristig wird dadurch die Intima-Media-Hyperplasie gemindert.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Campeau L. Percutaneous radial artery approach for coronary angiography. *Cathet Cardiovasc Diagn* [Internet]. 1989 Jan [cited 2019 Jan 9];16(1):3–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912567>
2. Neumann F-J, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* [Internet]. 2018 Aug 25 [cited 2019 Jan 9];40(2):87–165. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehy394/5079120>
3. Jolly SS, Yusuf S, Cairns J, Niemelä K, Xavier D, Widimsky P, et al. Radial versus femoral access for coronary angiography and intervention in patients with acute coronary syndromes (RIVAL): a randomised, parallel group, multicentre trial. *Lancet* [Internet]. 2011 Apr 23 [cited 2019 Jan 15];377(9775):1409–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611604042?via%3Dihub>
4. Ando T, Aoi S, Ashraf S, Villablanca PA, Tellia T, Briasoulis A, et al. Transradial versus transfemoral percutaneous coronary intervention of left main disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Catheter Cardiovasc Interv* [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2019 Jan 9];ccd.28025. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ccd.28025>
5. Valgimigli M, Gagnor A, Calabró P, Frigoli E, Leonardi S, Zaro T, et al. Radial versus femoral access in patients with acute coronary syndromes undergoing invasive management: a randomised multicentre trial. *Lancet* [Internet]. 2015 Jun 20 [cited 2019 Jan 15];385(9986):2465–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673615602926?via%3Dihub>
6. Pancholy SB, Patel G, Nanavaty SP, Pancholy MS. Cardiogenic shock and access site choice. *Minerva Cardioangiol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 15];65(1):74–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27727197>
7. Bianchi R, D’Acierno L, Crisci M, Tartaglione D, Cappelli Bigazzi M, Canonico M, et al. From Femoral to Radial Approach in Coronary Intervention. *Angiology* [Internet]. 2017 Apr 19 [cited 2019 Jan 15];68(4):281–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0003319716656714>
8. Hahalis G, Aznaouridis K, Tsigkas G, Davlourous P, Xanthopoulou I, Koutsogiannis N, et al. Radial Artery and Ulnar Artery Occlusions Following Coronary Procedures and the Impact of Anticoagulation: ARTEMIS (Radial and Ulnar ARTEry Occlusion Meta-Analysis) Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Hear Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 26];6(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5586412/>
9. Ayyaz Ul Haq M, Rashid M, Gilchrist IC, Bertrand O, Kwok CS, Wong CW, et al. Incidence and Clinical Course of Limb Dysfunction Post Cardiac Catheterization — A Systematic Review —. *Circ J* [Internet]. 2018 Oct 25 [cited 2019 Jan 16];82(11):2736–44. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/82/11/82_CJ-18-0389/_article
10. Stegemann E, Sansone R, Stegemann B, Kelm M, Heiss C. Validation of High-Resolution Ultrasound Measurements of Intima–Media Thickness of the Radial Artery for the Assessment of Structural Remodeling. *Angiology* [Internet]. 2015 Jul 5 [cited 2019 Jan 16];66(6):574–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0003319714544699>
11. Zhenxian Yan Z, Yujie Zhou Y, Yingxin Zhao Y, Zhiming Zhou Z, Shiwei Yang S, Zhijian Wang Z. Impact of Transradial Coronary Procedures on Radial Artery. *Angiology* [Internet]. 2010 Feb 8 [cited 2019 Mar 18];61(1):8–13. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0003319709348293>
12. Sansone R, Stegemann E, Ozaşlan G, Schuler D, Lukosz M, Rodriguez-Mateos A, et al. Early and late response-to-injury in patients undergoing transradial coronary angiography: arterial remodeling in smokers. *Am J Cardiovasc Dis* [Internet]. 2014 [cited 2018 Dec 4];4(2):47–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006532>
13. Wakeyama T, Ogawa H, Iida H, Takaki A, Iwami T, Mochizuki M, et al. Intima-media thickening of the radial artery after transradial intervention: An intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2003 Apr 2 [cited 2019 Mar 20];41(7):1109–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109703000895?via%3Dihub>
14. Staniloae CS, Mody KP, Sanghvi K, Mindrescu C, Coppola JT, Antonescu CR, et al. Histopathologic changes of the radial artery wall secondary to transradial catheterization. *Vasc Health Risk Manag* [Internet]. 2009 [cited 2019 Mar 20];5(3):527–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590587>

15. Lee JY, Kim YO. Pre-existing arterial pathologic changes affecting arteriovenous fistula patency and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2019 Jan 16];32(5):790–7. Available from: <http://kjim.org/journal/view.php?doi=10.3904/kjim.2017.268>
16. Gaudino M, Leone A, Lupascu A, Toesca A, Mazza A, Ponziani FR, et al. Morphological and functional consequences of transradial coronary angiography on the radial artery: implications for its use as a bypass conduit. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2019 Jan 17];48(3):370–4. Available from: <https://academic.oup.com/ejcts/article/48/3/370/384649>
17. Hamon M, Pristipino C, Di Mario C, Nolan J, Ludwig J, Tubaro M, et al. Consensus document on the radial approach in percutaneous cardiovascular interventions: position paper by the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions and Working Groups on Acute Cardiac Care** and Thrombosis of the European Society of Cardiology. *EuroIntervention* [Internet]. 2013 Mar [cited 2019 Jan 16];8(11):1242–51. Available from: http://www.pcronline.com/eurointervention/58th_issue/192
18. Shah B, Bangalore S, Feit F, Fernandez G, Coppola J, Attubato MJ, et al. Radiation exposure during coronary angiography via transradial or transfemoral approaches when performed by experienced operators. *Am Heart J* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2019 Jan 17];165(3):286–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002870312005959?via%3Dihub>
19. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* [Internet]. 1977 Mar [cited 2019 Jan 18];86(3):675–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/842616>
20. Davies MG, Hagen P-O. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* [Internet]. 1994 Sep 1 [cited 2019 Jan 22];81(9):1254–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.1800810904>
21. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2019 Jan 22];190(3):300–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-9896%28200002%29190%3A3%3C300%3A%3AAID-PATH596%3E3.0.CO%3B2-I>
22. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation* [Internet]. 2007 Jan 30 [cited 2019 Jan 23];115(4):459–67. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875>
23. Subbotin VM. Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis. *Theor Biol Med Model* [Internet]. 2007 Oct 31 [cited 2019 Jan 22];4:41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974015>
24. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2019 Jan 22];22(6):399–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541627>
25. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* [Internet]. 1995 Sep 1 [cited 2019 Jan 21];92(5):1355–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648691>
26. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *N Engl J Med* [Internet]. 1987 May 28 [cited 2019 Jan 21];316(22):1371–5. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198705283162204>
27. Hermiller JB, Tenaglia AN, Kisslo KB, Phillips HR, Bashore TM, Stack RS, et al. In vivo validation of compensatory enlargement of atherosclerotic coronary arteries. *Am J Cardiol* [Internet]. 1993 Mar 15 [cited 2019 Jan 18];71(8):665–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002914993910075?via%3Dihub>
28. Nishioka T, Luo H, Eigler NL, Berglund H, Kim C-J, Siegel RJ. Contribution of inadequate compensatory enlargement to development of human coronary artery stenosis: An in vivo intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2019 Jan 21];27(7):1571–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/073510979600071X>
29. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of “dilated” versus “obstructive” coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2019 Jan 21];38(2):297–306. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109701013742>
30. Mintz GS, Nissen SE, Anderson WD, Bailey SR, Erbel R, Fitzgerald PJ, et al. American College of Cardiology clinical expert consensus document on standards for acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound studies (ivus): A report of the american college of cardiology task force on

- clinical expert consensus do. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2019 Jan 21];37(5):1478–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109701011755>
31. Sipahi I, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Nicholls SJ, Ozduran V, Kapadia S, et al. Compensatory enlargement of human coronary arteries during progression of atherosclerosis is unrelated to atheroma burden: serial intravascular ultrasound observations from the REVERSAL trial. *Eur Heart J* [Internet]. 2006 Jan 25 [cited 2019 Jan 22];27(14):1664–70. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehi796>
 32. Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2019 Jan 21];27(8):1722–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.106.129254>
 33. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. Epstein FH, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 1999 Jan 14 [cited 2019 Jan 29];340(2):115–26. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199901143400207>
 34. Heiss C, Rodriguez-Mateos A, Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2015 May 10 [cited 2019 Jan 28];22(14):1230–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330054>
 35. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* [Internet]. 2007 Mar 13 [cited 2019 Jan 29];115(10):1285–95. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
 36. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2019 Jan 29];219(1):22–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12646>
 37. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* [Internet]. 1996 Nov [cited 2019 Jan 29];79(5):984–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8888690>
 38. Balligand J-L, Feron O, Dessy C. eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev* [Internet]. 2009 Apr [cited 2019 Jan 30];89(2):481–534. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00042.2007>
 39. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2019 Jan 30];280(2):F193–206. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.2001.280.2.F193>
 40. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med* [Internet]. 2004 Oct 20 [cited 2019 Jan 30];82(10):671–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-004-0580-x>
 41. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* [Internet]. 2003 Mar 4 [cited 2019 Jan 30];107(8):1164–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615796>
 42. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89(1).
 43. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Sep 8 [cited 2019 Mar 14];353(10):999–1007. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043814>
 44. Thijssen DHJ, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2018 Dec 6];300(1):H2–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952670>
 45. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002 Jan 16 [cited 2018 Nov 30];39(2):257–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109701017466>
 46. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* [Internet]. 2010 May [cited 2018 Aug 11];55(5):1075–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351340>

47. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Miller O. 1., Sullivan ID, Lloyd JK, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;
48. Uehata A, Lieberman EH, Gerhard MD, Anderson TJ, Ganz P, Polak JF, et al. Noninvasive Assessment of Endothelium-Dependent Flow-Mediated Dilation of the Brachial Artery. *Vasc Med [Internet]*. 1997 May 21 [cited 2018 Dec 4];2(2):87–92. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1358863X9700200203>
49. Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol [Internet]*. 2005 Sep [cited 2018 Dec 4];99(3):1233–4. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00601.2005>
50. Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol [Internet]*. 1990 Apr [cited 2018 Dec 4];258(4 Pt 2):H1004–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2184678>
51. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: A systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol [Internet]*. 2013 Sep 20 [cited 2019 Feb 26];168(1):344–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527312011539?via%3Dihub>
52. Schuler D, Sansone R, Freudenberger T, Rodriguez-Mateos A, Weber G, Momma TY, et al. Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]*. 2014 Dec [cited 2020 Feb 4];34(12):2651–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341800>
53. Thijssen DHJ, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, et al. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Circ Physiol [Internet]*. 2011 Jan [cited 2018 Dec 6];300(1):H2–12. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00471.2010>
54. Charakida M, de Groot E, Loukogeorgakis SP, Khan T, Lüscher T, Kastelein JJ, et al. Variability and reproducibility of flow-mediated dilatation in a multicentre clinical trial. *Eur Heart J [Internet]*. 2013 Dec 1 [cited 2019 Feb 26];34(45):3501–7. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/eh223>
55. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2003 Oct 1 [cited 2019 Jan 31];42(7):1149–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073510970300994X?via%3Dihub>
56. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res [Internet]*. 2016 Feb 19 [cited 2019 Jan 31];118(4):620–36. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
57. Heiss C, Balzer J, Hauffe T, Hamada S, Stegemann E, Koepfel T, et al. Vascular Dysfunction of Brachial Artery After Transradial Access for Coronary Catheterization: Impact of Smoking and Catheter Changes. *JACC Cardiovasc Interv [Internet]*. 2009 Nov 1 [cited 2019 Jan 23];2(11):1067–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936879809006487?via%3Dihub#>
58. Sansone R, Stegemann E, Ozaslan G, Schuler D, Lukosz M, Rodriguez-Mateos A, et al. Early and late response-to-injury in patients undergoing transradial coronary angiography: arterial remodeling in smokers. *Am J Cardiovasc Dis [Internet]*. 2014 [cited 2018 Dec 6];4(2):47–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006532>
59. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: Implications for end-organ damage. Vol. 105, *Journal of Applied Physiology*. 2008. p. 1652–60.
60. Vink A, Schoneveld AH, Poppen M, De Kleijn DPV, Borst C, Pasterkamp G. Morphometric and immunohistochemical characterization of the intimal layer throughout the arterial system of elderly humans. *J Anat*. 2002;200(1):97–103.
61. Heinen Y, Stegemann E, Sansone R, Benedens K, Wagstaff R, Balzer J, et al. Local association between endothelial dysfunction and intimal hyperplasia: relevance in peripheral artery disease. *J Am Heart Assoc [Internet]*. 2015 Feb 3 [cited 2019 Mar 21];4(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25648609>
62. Vita JA, Keaney JF. Endothelial Function. *Circulation [Internet]*. 2002 Aug 6 [cited 2019 Feb 23];106(6):640–2. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000028581.07992.56>
63. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles A Potential Prognostic Marker for

- Atherosclerotic Vascular Disease. 2006 [cited 2018 Dec 11]; Available from: <http://www.hypertensionaha.org>
64. VANWIJK M, VANBAVEL E, STURK A, NIEUWLAND R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2018 Dec 11];59(2):277–87. Available from: [https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(03\)00367-5](https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(03)00367-5)
 65. Martínez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2019 Jan 24];288(3):H1004–9. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00842.2004>
 66. Amabile N, Rautou P-E, Tedgui A, Boulanger C. Microparticles: Key Protagonists in Cardiovascular Disorders. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2010 Nov 10 [cited 2018 Dec 14];36(08):907–16. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1267044>
 67. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31 + /Annexin V + Apoptotic Microparticles Correlate With Coronary Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 Jan 28];26(1):112–6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000191634.13057.15>
 68. Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, Vascular Function, and Atherothrombosis. Weber C, Mause S, editors. *Circ Res* [Internet]. 2011 Aug 19 [cited 2019 Jan 28];109(5):593–606. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.233163>
 69. Sansone R, Baaken M, Horn P, Schuler D, Westenfeld R, Amabile N, et al. Release of endothelial microparticles in patients with arterial hypertension, hypertensive emergencies and catheter-related injury. *Atherosclerosis* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Jan 24];273:67–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915018301977?via%3Dihub>
 70. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, et al. Brief Secondhand Smoke Exposure Depresses Endothelial Progenitor Cells Activity and Endothelial Function. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2008 May 6 [cited 2018 Aug 10];51(18):1760–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109708007109>
 71. Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 [cited 2018 Dec 11];16:3381–8. Available from: www.jasn.org.
 72. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Lesèche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* [Internet]. 2000 May 30 [cited 2019 Jan 28];101(21):2450–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831515>
 73. Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* [Internet]. 2011 Aug 2 [cited 2019 Jan 28];32(16):2034–41. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehq478>
 74. Lee S-T, Chu K, Jung K-H, Kim J-M, Moon H-J, Bahn J-J, et al. Circulating CD62E+ Microparticles and Cardiovascular Outcomes. Arumugam T V., editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Apr 26 [cited 2019 Jan 28];7(4):e35713. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035713>
 75. Angelot F, Seillès E, Biichlé S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2019 Jan 28];94(11):1502–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648164>
 76. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res*. 2003;
 77. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett* [Internet]. 2003 Apr 10 [cited 2018 Dec 14];540(1–3):7–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303002242>
 78. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2018 Dec 14];145(6):962–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002870303001030?via%3Dihub>
 79. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* [Internet]. 1991 Mar

- 22 [cited 2018 Dec 14];251(5000):1451–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2006419>
80. Leach L, Clark P, Lampugnani MG, Arroyo AG, Dejana E, Firth JA. Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci* [Internet]. 1993 [cited 2018 Dec 17];104(4). Available from: <http://jcs.biologists.org/content/104/4/1073.long>
 81. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, et al. Circulating Endothelial Microparticle Levels Predict Hemodynamic Severity of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2008 Jun 20 [cited 2018 Dec 17];177(11):1268–75. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200710-1458OC>
 82. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* [Internet]. 1989 Mar 3 [cited 2018 Dec 17];243(4895):1160–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466335>
 83. Phillips D, Charo I, Parise L, Fitzgerald L. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* [Internet]. 1988 [cited 2018 Dec 17];71(4). Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/71/4/831.long?sso-checked=true>
 84. Heiss C, Keen CL, Kelm M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2019 Feb 24];31(21):2583–92. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehq332>
 85. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2019 Feb 24];81(1):317S-325S. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/81/1/317S/4607645>
 86. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, et al. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Jan 24 [cited 2019 Feb 25];103(4):1024–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418281>
 87. Christian Heiss;David Finis;Petra Kleinbongard;Arne Hoffmann;Tienush Rassaf;Malte Kelm;Helmut, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, et al. Sustained Increase in Flow-mediated Dilation After Daily Intake of High-flavanol Cocoa Drink Over 1 Week. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2019 Feb 25];49(2):74–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312446>
 88. Sansone R, Rodriguez-Mateos A, Heuel J, Falk D, Schuler D, Wagstaff R, et al. Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. 2015 [cited 2018 Aug 9]; Available from: <http://cvrisk.mvm.ed.ac.uk/>
 89. Ostertag LM, O’Kennedy N, Kroon PA, Duthie GG, de Roos B. Impact of dietary polyphenols on human platelet function – A critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2019 Feb 25];54(1):60–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200900172>
 90. Desch S, Schmidt J, Kobler D, Sonnabend M, Eitel I, Sareban M, et al. Effect of Cocoa Products on Blood Pressure: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Hypertens* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2019 Feb 25];23(1):97–103. Available from: <https://academic.oup.com/ajh/article-lookup/doi/10.1038/ajh.2009.213>
 91. Heiss C, Jahn S, Taylor M, Real WM, Angeli FS, Wong ML, et al. Improvement of Endothelial Function With Dietary Flavanols Is Associated With Mobilization of Circulating Angiogenic Cells in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2010 Jul 13 [cited 2019 Feb 25];56(3):218–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109710017365?via%3Dihub>
 92. Schewe T, Steffen Y, Sies H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2019 Feb 25];476(2):102–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986108001239?via%3Dihub>
 93. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation* [Internet]. 2009 Mar 17 [cited 2019 Mar 5];119(10):1433–41. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022>
 94. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013 May 10 [cited 2019 Feb 25];18(14):1818–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794138>
 95. Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart DA. Impact of Fermentation, Drying, Roasting, and Dutch

- Processing on Epicatechin and Catechin Content of Cacao Beans and Cocoa Ingredients. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010 Oct 13 [cited 2019 Feb 26];58(19):10518–27. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf102391q>
96. Sheryl A. Lazarus *, Gary E. Adamson, John F. Hammerstone A, Schmitz HH. High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. 1999 [cited 2019 Feb 26]; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9813642>
 97. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, et al. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2019 Feb 26];76(4):798–804. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/76/4/798/4677453>
 98. Black MA, Cable NT, Thijssen DHJ, Green DJ. Importance of Measuring the Time Course of Flow-Mediated Dilatation in Humans. *Hypertension* [Internet]. 2008 Feb [cited 2018 Dec 4];51(2):203–10. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101014>
 99. Logason K, Bärilin T, Jonsson M-L, Boström A, Hårdemark HG, Karacagil S. The Importance of Doppler Angle of Insonation on Differentiation Between 50–69% and 70–99% Carotid Artery Stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2018 Dec 17];21(4):311–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078588401913310?via%3Dihub>
 100. Preik M, Lauer T, Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated Ultrasonic Measurement of Human Arteries for the Determination of Endothelial Function. *Ultraschall der Medizin* [Internet]. 2003 Nov 10 [cited 2018 Aug 10];21(05):195–8. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2000-7989>
 101. Mancini GBJ, Yeoh E, Abbott D, Chan S. Validation of an automated method for assessing brachial artery endothelial dysfunction. *Can J Cardiol* [Internet]. 2002 Mar [cited 2018 Aug 10];18(3):259–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907614>
 102. Keymel S, Heinen Y, Balzer J, Rassaf T, Kelm M, Lauer T, et al. Characterization of macro- and microvascular function and structure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011 [cited 2018 Dec 6];1(1):68–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254187>
 103. LACROIX R, JUDICONE C, PONCELET P, ROBERT S, ARNAUD L, SAMPOL J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2018 Dec 6];10(3):437–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x>
 104. Horn P, Cortese-Krott MM, Amabile N, Hundsdörfer C, Kröncke K-D, Kelm M, et al. Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2012 Dec 31 [cited 2018 Dec 4];2(1):e003764. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525410>
 105. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2018 Dec 11];2(10):1842–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2004.00936.x>
 106. Agewall S, Doughty RN, Bagg W, Whalley GA, Braatvedt G, Sharpe N. Comparison of ultrasound assessment of flow-mediated dilatation in the radial and brachial artery with upper and forearm cuff positions. *Clin Physiol* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2018 Aug 10];21(1):9–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2281.2001.00302.x>
 107. Dawson EA, Rathore S, Cable NT, Wright DJ, Morris JL, Green DJ. Impact of catheter insertion using the radial approach on vasodilatation in humans. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2010 Feb 23 [cited 2019 Mar 18];118(10):633–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059449>
 108. Mitchell AJ, Mills NL, Newby DE, Cruden NLM. Radial artery vasomotor function following transradial cardiac catheterisation. *Open Hear* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 18];3(2):e000443. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27752330>
 109. Burstein JM, Gidrewicz D, Hutchison SJ, Holmes K, Jolly S, Cantor WJ. Impact of Radial Artery Cannulation for Coronary Angiography and Angioplasty on Radial Artery Function. *Am J Cardiol* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2019 Jan 23];99(4):457–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000291490602145X>
 110. Buturak A, Tekturk BM, Degirmencioglu A, Ulus S, Surgit O, Ariturk C, et al. Transradial catheterization may decrease the radial artery luminal diameter and impair the vasodilatation response in the access site

- at late term: an observational study. *Heart Vessels* [Internet]. 2016 Apr 5 [cited 2019 Mar 19];31(4):482–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00380-015-0640-x>
111. Madssen E, Haere P, Wiseth R. Radial Artery Diameter and Vasodilatory Properties After Transradial Coronary Angiography. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2019 Mar 19];82(5):1698–702. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003497506012252?via%3Dihub>
 112. Dharma S, Kedev S, Patel T, Sukmawan R, Gilchrist IC, Rao S V. Post-procedural/pre-hemostasis intra-arterial nitroglycerin after transradial catheterization: A gender based analysis. *Cardiovasc Revascularization Med* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Mar 27];17(1):10–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S155383891500319X?via%3Dihub>
 113. Rassaf T, Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Heiss C, Kleophas W, Dellanna F, et al. Vasculoprotective Effects of Dietary Cocoa Flavanols in Patients on Hemodialysis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016 Jan 7 [cited 2019 Mar 18];11(1):108–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681132>
 114. Fan Y, Fu X, Wang Y, Li W, Bi X, Wei L, et al. Effect of Long-Term Administration of Nicorandil on Endothelial Function of the Radial Artery in Patients With Angina Undergoing Transradial Percutaneous Coronary Intervention. *Angiology* [Internet]. 2017 Aug 4 [cited 2019 Mar 19];68(7):633–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0003319716675720>
 115. Heiss C, Sansone R, Karimi H, Krabbe M, Schuler D, Rodriguez-Mateos A, et al. Impact of cocoa flavanol intake on age-dependent vascular stiffness in healthy men: a randomized, controlled, double-masked trial. *Age (Dordr)* [Internet]. 2015 Jun [cited 2019 Mar 6];37(3):9794. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26013912>
 116. Lyle AN, Raaz U. Killing Me Unsoftly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2017 Feb [cited 2019 Mar 23];37(2). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.116.308563>
 117. Mattace-Raso FUS, van der Cammen TJM, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MADH, et al. Arterial Stiffness and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke. *Circulation* [Internet]. 2006 Feb 7 [cited 2019 Mar 23];113(5):657–63. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.555235>
 118. Hansen L, Taylor WR. Is increased arterial stiffness a cause or consequence of atherosclerosis? *Atherosclerosis* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 25];249:226–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27133480>
 119. Zou J, Huang Y, Cao K, Yang G, Yin H, Len J, et al. Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2019 Mar 21];68(2):153–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320500009255?via%3Dihub>
 120. Khandelwal AR, Hebert VY, Dugas TR. Essential role of ER- α -dependent NO production in resveratrol-mediated inhibition of restenosis. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2019 Mar 21];299(5):H1451–8. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00369.2010>
 121. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen Increases Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell Production and Diminishes Neointima Formation. *Circulation* [Internet]. 2003 Jun 24 [cited 2019 Mar 20];107(24):3059–65. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000077911.81151.30>
 122. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, et al. Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialization and Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2019 Mar 20];22(10):1567–72. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000036417.43987.D8>
 123. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation* [Internet]. 2004 Jan 20 [cited 2019 Mar 20];109(2):220–6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.000109141.48980.37>
 124. Horn P, Amabile N, Angeli FS, Sansone R, Stegemann B, Kelm M, et al. Dietary flavanol intervention lowers the levels of endothelial microparticles in coronary artery disease patients. *Br J Nutr* [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2019 Mar 6];111(07):1245–52. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114513003693

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: gesunder Gefäßabschnitt (a), positives (b) und negatives <i>Remodeling</i> (c).....	6
Abb. 2: flavonoides Grundgerüst	16
Abb. 3: Strukturformel des Flavanol-Monomers (-) - Epicatechin	17
Abb. 4: Studienprotokoll.....	22
Abb. 5: Fluss der Studienteilnehmer.....	24
Abb. 6: Durchführung der FMD-Messung	27
Abb. 7: FMD-Messung mittels <i>Brachial Analyzer Software</i>	28
Abb. 8: IMT-Messung mittels <i>Brachial Analyzer Software</i>	30
Abb. 9: Änderung der FMD der <i>A. radialis</i> am Katheterarm zwischen den Zeitpunkten -2 h, +2 h und 6 M zu <i>baseline</i>	40
Abb. 10: Änderung (Delta) der FMD der <i>A. radialis</i> am Kontrollarm zwischen den Zeitpunkten -2 h, +2 h und 6 M zu <i>baseline</i>	41
Abb. 11: Änderung (Delta) der IMT der <i>A. radialis</i> am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu <i>baseline</i> in der Flavanol-Gruppe und Placebo-Gruppe.....	42
Abb. 12: Änderung (Delta) des inneren Diameters der <i>A. radialis</i> am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu <i>baseline</i>	44
Abb. 13: Änderung (Delta) des äußeren Diameters der <i>A. radialis</i> am Katheterarm zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu <i>baseline</i>	45
Abb. 14: Änderung (Delta) der CD31+41- EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu <i>baseline</i>	46
Abb. 15: Änderung (Delta) der CD144+ EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M und <i>baseline</i>	47
Abb. 16: Änderung (Delta) der CD62E+ EMP-Plasmalevel zwischen den Zeitpunkt -2 h, +2 h und +6 M zu <i>baseline</i>	48
Abb. 17: <i>Graphical abstract</i>	65

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Test-Kapseln	23
Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Antikörper bzw. Isotyp-Kontrollen und deren Funktionen	33
Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Studienpopulation (A) und prozedurale Spezifika (B).....	36
Tabelle 4: Gefäßfunktionelle und -strukturellen Parameter sowie die Plasmakonzentration der endothelialen Mikropartikel zu Beginn der Studie (<i>baseline</i>), zwei Stunden vor (-2 h), zwei Stunden (+2 h) sowie sechs Monate (+6 M) nach transradialer Herzkatheteruntersuchung und deren absolute Änderung (Delta) zum Ausgangswert (<i>baseline</i>)	38

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Heiss für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Entwicklung des Projektes sowie dessen Begleitung. Seine wissenschaftliche Erfahrung und Kreativität waren unersetzbar und haben mein wissenschaftliches Arbeiten entscheidend mitgeprägt.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Roberto Sansone danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung. Er stand mir sowohl in wissenschaftlichen als auch in organisatorischen Fragen zuverlässig und engagiert zur Seite. Seine Begeisterung für Wissenschaft und Klinik motivierten mich sehr.

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Möglichkeit, neben einer exzellenten klinischen Ausbildung, selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen und dieses in den klinischen Alltag zu implementieren.

Ein weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler für ihre gutachterliche Tätigkeit.

Frau Dr. med. Göksen Özaskan, Herrn Dr. med. Nicolas Kramser, Herrn Dr. med. Michael Gröne sowie allen weiteren Mitgliedern der angiologischen Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der Methodik und den wissenschaftlichen Diskurs in den AG-Treffen.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des kardiologischen Labors.

In besonderer Weise danke ich meiner Familie und meinem Ehemann Dominik. Ihr bedingungsloser Rückhalt ist für mich unbeschreiblich wertvoll. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.