

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
Homburg/ Saar

DIE BEDEUTUNG POSTPRANDIALER
TRIGLYCERIDE FÜR
MONOZYTÄRE UND HUMORALE
INFLAMMATORISCHE
PARAMETER DER ATHEROSKLEROSE

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Vorgelegt im Jahr 2012
von Maria Elisabeth Faas,
geboren am 9. Januar 1985 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Abstract	1
2	Einleitung	5
2.1	Bedeutung der Atherosklerose	5
2.2	Die Pathophysiologie der Atherosklerose	6
2.3	Der entzündliche Charakter der Atherosklerose	7
2.3.1	Die Rolle der Leukozyten im Allgemeinen für die Atherosklerose	9
2.3.2	Die Rolle der Monozyten für die Atherosklerose	10
2.3.3	Atherosklerose und Lipide, insbesondere Triglyceride	17
2.4	Fragestellung der Arbeit	20
3	Material, Probanden und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Auswertungs- und Statistikprogramme	26
3.2	Charakterisierung des Probandenkollektivs	27
3.3	Methoden	28
3.3.1	Der orale Triglyceridtoleranztest	28
3.3.2	Lipidprofil, Blutbild, Differentialblutbild, CRP	29
3.3.3	Durchflusszytometrie	30
3.3.4	Experimente an isolierten Monozyten	34
3.3.5	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	38
3.3.6	Statistische Methoden	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Gesunde Probanden (oTT und nüchtern)	40
4.1.1	Grundcharakteristika	40
4.1.2	Lipidprofil	41
4.1.3	Differentialblutbild	42
4.1.4	Monozyten	47
4.2	Patienten mit koronarer Herzkrankheit	52
4.2.1	Grundcharakteristik	52
4.2.2	Lipidprofil	53
4.2.3	Differentialblutbild	54
4.2.4	Monozyten	56
4.3	Korrelationsanalysen	58
5	Diskussion	59
5.1	Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Methodik	59
5.1.1	Der Beobachtungszeitraum	59
5.1.2	Die Analysemethoden	60
5.1.3	Das Probandenkollektiv	61
5.1.4	Die Testmahlzeiten	61

5.2	Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Ergebnisse	63
5.2.1	Die induzierte Triglyceridämie	63
5.2.2	Auswirkungen auf das Differentialblutbild	64
5.2.3	Auswirkungen auf zirkulierende Monozyten	65
5.2.4	Auswirkungen auf humorale Parameter	67
5.3	Implikationen für die Atheroskleroseforschung	68
5.3.1	Zirkulierende Monozyten als Surrogatparameter der Atherosklerose	68
5.3.2	Postprandiale Mechanismen der Atherosklerose	71
5.3.3	Zirkadiane Rhythmik proatherogener Parameter	74
6	Literaturverzeichnis	77
7	Abkürzungsverzeichnis	92
8	Veröffentlichungen	94
9	Dank	95

1 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass die Messung der postprandialen Serumtriglyceride eine höhere Aussagekraft bezüglich des kardiovaskulären Risikos hat als die Messung beim nüchternen Patienten.

Atherosklerose ist eine entzündliche Krankheit, bei der es zu Ansammlungen von Lipiden und bindegewebigen Anteilen in der Arterienwand kommt. Hierbei spielen Monozyten, die sich durch Aufnahme von Lipoproteinen zu Schaumzellen entwickeln, eine entscheidende Rolle.

Diese Arbeit beschäftigt sich dem Effekt einer postprandialen Triglyceridämie auf inflammatorische, insbesondere monozytäre Parameter der Atherosklerose, mit dem Ziel eine mögliche Triglycerid-induzierte Monozytenaktivierung zu identifizieren. Hierzu wurden zunächst 23 Probanden ohne bekannte kardiovaskuläre Vorerkrankungen untersucht. Ein Teil dieser Probanden fungierte in einem weiteren Versuchsdurchlauf als Negativkontrolle. Außerdem wurden 30 Probanden mit koronarangiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit (KHK) untersucht. Zur Induktion einer Triglyceridämie wird ein oraler Triglyceridtoleranztest (oTT) bestehend aus 250 ml Sahne mit einem Fettanteil von 30–32 % eingesetzt. Zur Negativkontrolle wurde statt Sahne Wasser aufgenommen.

Nach oTT kam es zu einem signifikanten Anstieg der Serumtriglyceridkonzentration, der sich bei der Negativkontrolle nicht zeigte. Unabhängig von der Triglyceridbelastung kam es zu einem relativen Anstieg der neutrophilen Granulozyten zugunsten eines Abfalls der Lymphozyten und der Monozyten, wobei die Leukozytenkonzentration an sich unverändert blieb. Die Expression des Oberflächenproteins CD11b auf Monozyten blieb stets unverändert. Die Expression von CD14 auf Monozyten blieb bei den gesunden Probanden nach oTT gleich, nach Wasser fiel sie ab. Bei KHK-Patienten fiel sie nach oTT ab. Die Zusammensetzung der zirkulierenden Monozyten bezüglich ihrer Subpopulationen, die anhand der Expression von CD14 und CD16 definiert sind, blieb sowohl 5 h nach der Aufnahme von Sahne als auch von Wasser unverändert. Es konnte keine triglyceridbedingte Veränderung der monozytären Genexpression von IL6, IL1 β , MCP1 und TNF α beobachtet werden. Die unveränderten Serumkonzentrationen von TNF α und von

sICAM deuten darauf hin, dass es nach oTT weder zu erhöhter systemischer Inflammation noch zu verstärkter endothelialer Aktivierung kommt. Die Serumkonzentration des CCR2-Liganden MCP1 zeigte sowohl nach oTT als auch nach Wasser einen Abfall. Die Konzentration des Chemokins Fractalkine blieb stets unverändert. Bezüglich der Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren auf zirkulierenden Monozyten ergab die vorliegende Arbeit, dass die Expression von CCR2 und CX3CR1 durch orale Triglyceridaufnahme moduliert wird. Die MFI beider Rezeptoren sank in der Gruppe der Negativkontrolle signifikant innerhalb der Beobachtungszeit, während sie nach dem oTT unverändert blieb. Dies impliziert, dass die Expression dieser Chemokinrezeptoren einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, welche durch Triglyceridbelastung moduliert wird.

Insgesamt bietet die vorliegende Arbeit wenig Anhalt für einen Einfluss postprandialer Triglyceride auf zirkulierende Monozyten und inflammatorische Moleküle. Insbesondere zeigt sich keine quantitative Korrelation zwischen der postprandialen Triglyceridkonzentration und den untersuchten Parametern der Monozytenaktivierung.

Abstract

Epidemiologic studies suggest that postprandially obtained triglyceride levels play a more important role for the cardiovascular risk evaluation than fasting triglycerides.

Atherosclerosis is an inflammatory disease which is characterized by an accumulation of lipids and connective tissue in the arterial vessel wall. Monocytes, which form foam-cells by taking up lipoproteins, play a crucial role in the formation and progression of atherosclerotic plaques.

Working on the postprandial effect of triglyceridemia on inflammation and particularly on monocytes, this study aims to identify potential triglyceride-induced monocyte activation. First, 23 healthy subjects without any cardiovascular disease were tested. A part of them formed a control group. Furthermore we investigated 30 patients with coronary heart disease proofed by angiography. An oral triglycerid tolerance (oTT) test consisting of 250 ml fresh whipping cream (fat content 30-32 %) was used to induce a triglyceridemia. In the control group water was used instead of cream.

After oTT triglyceride levels increased significantly, while they remained unchanged in the control group. The neutrophil count increased, whereas lymphocyte and monocyte counts decreased after oTT as well as after water. The leukocyte count remained unchanged. The expression of CD11b on monocytes always remained unchanged. The expression of CD14 remained unchanged in healthy subjects after oTT and decreased in the control group. In patients with CAD it decreased after oTT. The frequency of the monocyte subsets, defined according to their expression of CD14 and CD16, remained unchanged after water as well as after oTT. Triglycerid-dependend alterations of the gene-expression of IL6, IL1 β , MCP1 and TNF α were not observed. The constant serum concentrations of TNF α and sICAM suggest that the oTT does neither leads to an increased systemic inflammation, nor to an endothelial activation. The serum concentration decreased after oTT as well as after water. The serum concentration of fractalkine always remained unchanged. Concerning the expression of chemokine receptors on monocytes, this study showed that the oral fat load modulates the expression of CCR2 and CX3CR1. The MFI of these receptors decreased significantly in the control group whereas it remai-

ned unchanged after oTT. That implies that the expression of these chemokine receptors exhibit a circadian variation which is modulated by oral fat load.

In summary this study does not provide evidence for an influence of postprandial triglycerides on circulation monocytes and inflammatory cytokines. In particular there was no quantitative correlation between the postprandial triglyceride concentration and the investigated parameters of monocyte activation.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Erkrankung der Gefäßwände, bei der es zu plaqueförmigen Verdickungen und Verhärtungen kommt. Sie betrifft verschiedene Gefäßregionen. Klinische Folgen ergeben sich in Abhängigkeit vom betroffenen Gefäßbett. Zum Beispiel kann Atherosklerose im zentralen Nervensystem Schlaganfälle und zerebrale Ischämien verursachen. In der Peripherie ist Atherosklerose die Ursache für Durchblutungsstörungen, die sich in Form von *Claudicatio intermittens* oder Gangrän äußern können. Die Atherosklerose der Herzkranzgefäße führt zur koronaren Herzkrankheit (KHK), welche Myokardinfarkte und Herzinsuffizienz zur Folge haben kann.

Insbesondere die Manifestationen der Atherosklerose am Herzen sind von großer epidemiologischer und gesundheitspolitischer Bedeutung: Atherosklerotisch bedingte Krankheiten des Herzens führen die deutsche Todesursachenstatistik des deutschen Statistischen Bundesamtes an: 2010 verstarben 72 734 Menschen infolge einer chronisch ischämischen Herzkrankheit^{121;122}. Das entspricht 8,5 % der Verstorbenen dieses Jahres. In der Statistik folgen der akute Myokardinfarkt mit einem Anteil von 6,5 % und die Herzinsuffizienz mit einem Anteil von 5,6 % aller Todesursachen¹²¹. Die Daten der Bundesrepublik Deutschland sind beispielhaft für die Industrienationen und die ganze Welt.

Atherosklerotische bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen führen nicht nur zu einem Verlust an Lebenszeit sondern auch an Lebensqualität. In das Konzept der *Disability Adjusted Life Years* (behinderungsbereinigte Lebensjahre, DALY) gehen sowohl die Anzahl der durch frühzeitigen Tod verlorenen Lebensjahre als auch der Grad der durch eine Krankheit verursachten Behinderung ein. 2002 nahm die KHK weltweit Platz 6 in diesem Konzept ein. Es wird geschätzt, dass sie 2030 Platz 3 einnehmen wird⁷⁴.

Atherosklerotisch bedingte Krankheiten beeinträchtigen die Gesellschaft überdies durch die enormen Kosten, die sie verursachen. Sowohl die direkten als auch die indirekten Kosten, die durch kardiovaskuläre Krankheiten und Apoplexie verursacht werden, steigen ständig an. Kardiovaskuläre Krankheiten kosten mehr als irgendwelche anderen Krankheiten¹³⁵.

2.2 Die Pathophysiologie der Atherosklerose

Bei der Atherosklerose kommt es zu Ansammlungen von Lipiden und bindegewebigen Anteilen in der Arterienwand. Die frühesten atherosklerotischen Läsionen werden Fettstreifen genannt. Sie bestehen aus den sogenannten Schaumzellen, die sich im subendothelialen Raum der Arterienwand ansammeln. Schaumzellen sind Makrophagen, die sich aus Monozyten durch Aufnahme von modifizierten (zum Beispiel oxidierten) Lipoproteinen entwickeln. Fettstreifen werden beim Menschen ab der ersten Lebensdekade beobachtet und sind ohne direkte klinische Folgen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich aus dem Fettstreifen eine fortgeschrittene fibröse atherosklerotische Läsion entwickelt. Diese besteht aus einem lipideichen nekrotischen Kern und einer fibrösen Kappe, die vor allem aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht. Diese Plaques werden zusehends komplexer. Es kommt zu Kalzifizierungen und Ulzerationen an der lumenzugewandten Seite. Abbildung 1 auf der nächsten Seite zeigt die Entwicklung einer komplexen atheromatösen Läsion.

Atherosklerotische Plaques können über verschiedene Mechanismen klinisch apparent werden. Zum Einen können fortgeschrittene Plaques durch ihre Größe Gefäße stenosieren. Eine andere klinisch wichtige Komplikation einer atherosklerotischen Plaque ist seine Ruptur, die zur Thrombenbildung führt und eine akute Minderperfusion distal der Läsion nach sich zieht⁶⁶.

Die Atherosklerose stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar, zu deren Manifestation verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren beitragen. Die kumulative Inzidenz von Risikofaktoren führt zu einer überadditiven Steigerung des kardiovaskulären Risikos⁸⁷. Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren werden in modifizierbare wie Zigarettenrauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Dyslipidämie in Form eines erhöhten LDL-Cholesterins und eines erniedrigten HDL-Cholesterins und in nicht-modifizierbare wie positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, männliches Geschlecht und Alter unterteilt.

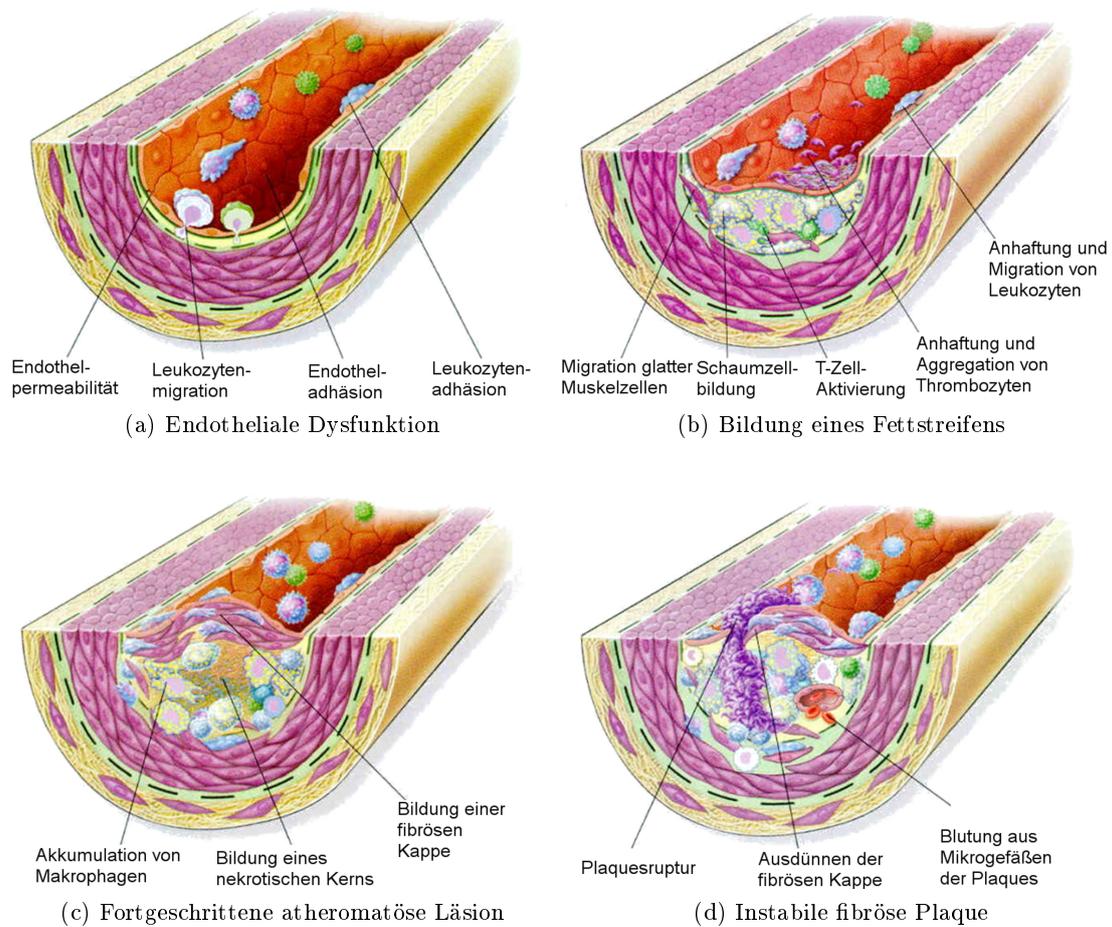


Abbildung 1: Die Atherogenese modifiziert nach Ross¹⁰⁷

2.3 Der entzündliche Charakter der Atherosklerose

Man war lange der Meinung, dass vor allem die Einlagerung von Lipiden für die Atherosklerose verantwortlich sei. Heute stimmt man überein, dass weit mehr zelluläre und molekulare Mechanismen an der Atherosklerose beteiligt sind und sie nicht nur eine Stoffwechsel- sondern auch eine entzündliche Krankheit ist¹⁰⁷.

Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Inflammation, Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen wird wie folgt beschrieben: Die Risikofaktoren führen in den Gefäßen zu oxidativem und mechanischem Stress. Dadurch kommt



Abbildung 2: Das kardiovaskuläre Kontinuum, modifiziert nach Dzau³²

es zur endothelialen Dysfunktion, welche sich auf vasoaktive Mediatoren auswirkt, inflammatorische Prozesse hervorruft und vaskuläres *Remodelling* bewirkt. Infolge davon entsteht eine frühe Gewebisdysfunktion. Diese bildet die Grundlage für Atherothrombose und progressive kardiovaskuläre Krankheiten. Diese äußern sich in Form von Gewebeschäden zum Beispiel als Myokardinfarkt, Schlaganfall, Niereninsuffizienz oder pAVK. Im Rahmen eines pathologischen Umbaus dieser Läsionen entstehen Endorganschäden bis hin zum Organversagen, das schließlich zum Tode führt³².

Abbildung 2 auf der vorherigen Seite fasst dieses kardiovaskuläre Kontinuum zusammen.

2.3.1 Die Rolle der Leukozyten im Allgemeinen für die Atherosklerose

Die pathogenetische Bedeutung von Leukozyten

Von allen Leukozyten spielen vor allem die T-Lymphozyten und die zirkulierenden Monozyten bei der Atherosklerose eine entscheidende Rolle⁴⁵. Sie wandern in die Arterienwand ein. Die Monozyten differenzieren sich nach der Migration in Makrophagen, welche sich durch die Aufnahme von oxidierten LDL-Cholesterin-Partikeln zu sogenannten Schaumzellen entwickeln. Die Schaumzellen bilden zusammen mit einer variablen Anzahl an T-Lymphozyten den Fettstreifen¹⁰⁶ und stehen so am Anfang der Atherogenese. Auch die reife atheromatöse Plaque enthält aus Monozyten entstandene Makrophagen und T-Lymphozyten sowohl in der Kernregion als auch in seiner fibrösen Kappe⁷³. Ist diese dünn und makrophagenreich, wird sie instabil und es droht eine Plaqueruptur. Leukozyten sind also in allen Stadien der Atherosklerose vertreten, was nochmals den inflammatorischen Charakter der Atherosklerose unterstreicht.

Die Aussagekraft der Leukozytenzahl im Blut

Im Blut zirkulieren nur 5-10% der Leukozyten. Daher bildet ihre Konzentration im Blut nicht automatisch das Risiko für Atherosklerose und ihre Folgeerscheinungen ab. Allein klinische Studien ermöglichen es, zu prüfen, ob die Zellkonzentrationen im Blut eine prädiktive Qualität haben. Es konnte gezeigt werden, dass sich anhand hoher Anzahlen

sowohl von Leukozyten insgesamt als auch von neutrophile Granulozyten und Monozyten im Blut die Inzidenz und die Prognose atherosklerotisch bedingter kardiovaskulärer Krankheiten abschätzen lassen.

Eine erhöhte Leukozytenkonzentration im Blut wird mit einem erhöhten Risiko für KHK-bedingte Morbidität und Mortalität assoziiert. Auch nach Adjustierung für andere Risikofaktoren insbesondere für Zigarettenrauchen bleibt diese Assoziation bestehen. Eine erhöhte Leukozytenkonzentration kann also als unabhängiger Risikofaktor betrachtet werden^{25;26;68}. Was das Differentialblutbild betrifft, so wird eine erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten mit einer erhöhten KHK-Inzidenz assoziiert⁶⁸. Nach Myokardinfarkt gehen eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten sowie eine Verminderung der Lymphozyten mit einer erhöhten Sterblichkeit einher. Die erhöhte Konzentration der neutrophilen Granulozyten hat dabei die stärkste Aussagekraft³⁰.

2.3.2 Die Rolle der Monozyten für die Atherosklerose

Monozyten sind in allen Stadien der Atherosklerose präsent. Man geht davon aus, dass Monozyten über transendotheliale Migration in die Arterienwand gelangen, was jedoch noch nicht direkt beobachtet werden konnte⁶³. Nach dem klassischen Modell beinhaltet sie folgende Schritte⁶²:

- Einfangen und *Rolling* (Selectine)
- Aktivierung (endothelständige Chemokine)
- Arrest (Adhäsionsmoleküle)
- feste Adhäsion (Integrine)
- Diapedese

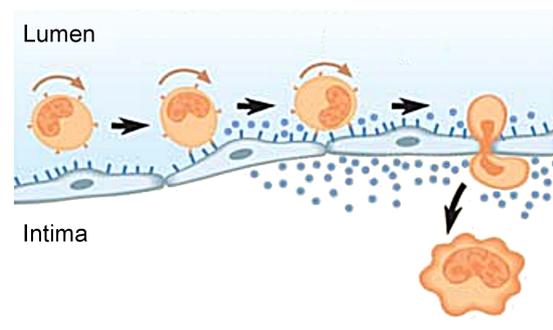


Abbildung 3: Rekrutierung von Monozyten in eine atherosklerotische Läsion, modifiziert nach Hanson⁴⁶

Die Einwanderung von Monozyten ist aber nicht nur ein Phänomen der frühen atherosklerotischen Läsion. Auch in fortgeschrittene Plaques werden Monozyten rekrutiert. Dabei ist die Akkumulation der Monozyten proportional zur Größe der atherosklerotischen Läsion¹²⁴. Es ist bisher unbekannt, ob eine Aktivierung zirkulierender Monozyten eine verstärkte Atherosklerose widerspiegelt. Untersuchungen der Genexpression zirkulierender Monozyten weisen auf Unterschiede zwischen Patienten mit atherosklerotischem Gefäßsystem und solchen ohne Atherosklerose hin¹¹⁴.

CD14

Neben neutrophilen Granulozyten exprimieren vor allem Monozyten und Makrophagen den Rezeptor CD14 (*cluster of differentiation*) für Lipopolysaccharid (LPS), der daher zur Identifikation dieser Zellen genutzt wird. Es handelt sich um ein GPI-verankertes Oberflächenmolekül ohne Transmembrandomäne. CD14 benötigt also Co-Rezeptoren zur Signaltransduktion.

Monozyten exprimieren nach der Stimulation mit LPS mehr CD14⁵⁹. Daher gilt die Expression von CD14 als Marker monozytärer Aktivierung.

Das Oberflächenmolekül CD 14 ist über verschiedene Mechanismen an der Atherogenese beteiligt. Zum Einen ist es an der MAC-1- (*Macrophage antigen-1*)-vermittelten Adhäsion von Monozyten an aktiviertem Endothel beteiligt¹⁰. Darüber hinaus bindet CD14 im Zusammenspiel mit TLR4 minimal modifiziertes LDL (mmLDL), das im Gegensatz zu oxidiertem LDL (oxLDL) nicht von Scavenger-Rezeptoren erkannt wird. Dadurch wird die Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose apoptotischer Zellen reduziert, wohingegen die Aufnahme von oxLDL verstärkt wird⁸¹.

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) inhibieren die Expression von CD14¹⁰⁹. Obwohl Statine zur Medikation der meisten KHK-Patienten gehören, konnte eine Studie bei KHK-Patienten mit Diabetes mellitus eine höhere MFI von CD14 auf zirkulierenden Monozyten als bei Patienten mit Diabetes mellitus ohne KHK zeigen⁹⁵.

CD11b

CD11b bildet zusammen mit CD18 das β_2 -Integrin MAC-1. MAC-1 bindet an ICAM-1 und fördert so die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Des Weiteren ist es an der endothelialen Migration von Monozyten beteiligt⁷⁷. MAC-1 spielt also eine wichtige Rolle in der Atherogenese.

MAC-1 liegt intrazellulär in Vesikeln vor und wird bei der Aktivierung von Leukozyten rasch in die Zelloberfläche integriert⁷⁹. Verschiedene Stimuli, unter anderem oxLDL¹³⁸ und MCP1 (*Monocyte-chemottractant-protein-1*)¹³², führen zu einer verstärkten Expression von CD11b auf Monozyten. Daher nutzt man die durchflusszytometrische Bestimmung von CD11b auf der Zelloberfläche zirkulierender Monozyten zur Abschätzung des Grades ihrer Aktivierung. Dabei spiegelt die Expression der zirkulierenden Monozyten die CD11b-Expression von Schaumzellen wider²⁷.

Chemokine und ihre Rezeptoren

Die Interaktion von Chemokinen und ihren Rezeptoren spielt eine entscheidende Rolle für die Migration von Monozyten in die Intima und ist damit ein wichtiger Schritt der Atherogenese.

Chemokine sind relativ kleine Proteinesequenzen, die eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Es handelt sich um Peptide, die aus 70 bis 125 Aminosäuren bestehen und viele basische Aminosäurereste tragen. Sie werden anhand der Anzahl und der Lage ihrer N-terminalen Cysteinreste klassifiziert. Dabei werden Cysteinreste mit C und andere Aminosäurereste mit X angegeben. Folgende vier Chemokingruppen sind derzeit bekannt: CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine¹⁰⁸. Chemokine wirken über G-gekoppelte Rezeptoren auf Leukozyten. Die leukozytäre Reaktion ist abhängig von der Stärke und dem Muster der Expression von Chemokinrezeptoren.

MCP1 und CCR2 Das *Monocyte chemottractant protein-1* (MCP1, Synonom: CCL2) gehört zur Gruppe der CC-Chemokine und wird von Endothelzellen und Monozyten produziert. MCP1 wirkt über verschiedene Mechanismen proatherogen,

Die Inkubation von Monozyten mit MCP1 steigert deren CD11b-Expression und er-

leichtert so ihre Endotheladhäsion¹³². In den makrophagenreichen Läsionen des Fettstreifens kann die Expression von MCP1 nachgewiesen werden⁸⁸. Da minimal oxidiertes LDL im Gegensatz zu nativem LDL die Expression von MCP1 steigert²⁴, geht man davon aus, dass MCP1 das Bindeglied zwischen oxidierten Lipoproteinen und einer vermehrten Chemoattraktion von Monozyten, die sich zu Schaumzellen entwickeln, darstellt²¹. Auch Chylomikronen und ihre *remnant-particles* steigern die MCP1-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen²⁹.

Über diese theoretischen Pathomechanismen hinaus belegen tierexperimentelle Befunde die Bedeutung von MCP1 und seines Rezeptors CCR2 für die Atherogenese. Es konnte gezeigt werden, dass bei Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, die den MCP1-Rezeptor CCR2 nicht exprimieren, unter einer stark fetthaltigen Diät die atherosklerotischen Läsionen signifikant verkleinert sind¹⁴. Analog dazu ist der Gehalt von Makrophagen und Lipiden in diätinduzierten, atherosklerotischen Initialläsionen geringer bei Mäusen, die kein MCP1 exprimieren⁴⁴. Eine verstärkte MCP1-Exposition über vermehrte Genexpression oder exogene Zufuhr führt hingegen zu einer Vergrößerung der atherosklerotischen Läsionen^{1;110}

Fractalkine und CX3CR1 Fractalkine ist ein Chemokin, das als membrangebundener Rezeptor auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird. Darüber hinaus, wird über Proteolyse lösliches Fractalkine freigegeben⁹. Der Fractalkine-Rezeptor CX3CR1 wird vor allem auf natürlichen Killerzellen, T-Lymphozyten und Monozyten exprimiert⁵². Über die Interaktion von membrangebundenem Fractalkine und CX3CR1 kommt es integrinunabhängig zur Endotheladhäsion von Leukozyten³⁵. Lösliches Fractalkine bewirkt eine transendotheliale Migration von Lymphozyten und Monozyten⁵². Darüber hinaus hat Fractalkine eine antiapoptotische Wirkung auf Monozyten und Schaumzellen⁶⁰. Es liegt also nahe, dass die Interaktion von Fractalkine und CX3CR1 eine wichtige Rolle in der Atherogenese spielt.

Dieser Verdacht wurde durch Untersuchungen an humanen Arterien erhärtet. Die Expression von Fractalkine ist in komplexen atherosklerotischen Plaques besonders hoch⁴³. Auch im Tiermodell konnte die proatherogene Rolle von CX3CR1 und Fractalkine bestä-

tigt werden. Bei Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, die kein Fractalkine exprimieren, ist die Größe atherosklerotischer Initiailläsionen signifikant kleiner als bei solchen Mäusen, die Fractalkine exprimieren^{23;61}. Umgekehrt weisen CX3CR1-defiziente, Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse geringere atherosklerotische Läsion der Arteria brachiocephalica auf als Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, die CX3CR1 exprimieren¹²⁸.

Cytokine

TNF α TNF α ist ein proinflammatorisches Cytokin. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert, wiewohl es auch von anderen Zelltypen sezerniert wird. Dabei führen verschieden Stimuli zu einer vermehrten Produktion von TNF α , wobei LPS der stärkste Induktor ist¹³⁴.

Es liegt nahe, dass TNF α neben vielen anderen inflammatorischen Prozessen auch an der Atherosklerose beteiligt ist, da die Expression von TNF α in atherosklerotischen Plaques durch Makrophagen¹³⁰, glatte Muskelzellen und zu einem geringeren Anteil durch Endothelzellen⁸ nachgewiesen werden konnte. TNF α wirkt auf verschiedene Arten proatherogen.

TNF α fördert in vielen Zelltypen, unter anderem in Makrophagen und Endothelzellen, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies¹²⁹. Diese beeinträchtigen die Aktivität von Stickstoffmonoxid und begünstigen möglicherweise so die Schädigung und den Funktionsverlust des Gefäßendothels¹⁶.

TNF α spielt eine wichtige Rolle bei den Umbauvorgängen des Gefäßendothels in den frühen Stadien der Atherosklerose. Es reguliert die Expression vieler Mediatoren wie Wachstumsfaktoren^{105;134}, Adhäsionsmolekülen¹²³, Cytokinen¹³⁴, Matrixmetalloproteinasen⁶⁴. Darüber hinaus hat TNF α einen direkten Einfluss auf das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur und auf den Prozess der Migration¹²⁰.

Monozyten und Makrophagen sind nicht nur die Hauptproduzenten von TNF α , sondern auch die Hauptzielzellen des Cytokins. TNF α induziert in diesen Zellen seine eigene Synthese¹³⁴. Darüber hinaus wirkt es auf Monozyten antiapoptotisch⁷¹. *In vitro* konnte eine chemotaktische Wirkung von TNF α auf Monozyten beobachtet werden¹³⁶.

Das Ausmaß der Bedeutung von TNF α für die Atherogenese konnte tierexperimentell gezeigt werden: Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, die TNF α exprimieren zeigen doppelt so große atheromatöse Areale wie Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, die kein TNF α exprimieren¹⁵.

TNF α spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Atherogenese, seine Konzentration im Blut korreliert auch mit klinischen Manifestationen der Atherosklerose. Sie korreliert mit der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis als Marker präklinischer Atherosklerose¹¹⁸. Bei Patienten mit frühzeitiger Koronarsklerose konnte eine erhöhte Konzentration des Cytokins im Serum festgestellt werden⁵⁵, wobei die TNF α -Konzentration nicht mit dem Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen korreliert^{34;55}. Die TNF α -Konzentration im Plasma ist ein Prädiktor für rekurrente kardiovaskuläre Ereignisse nach Myokardinfarkt¹⁰¹.

Interleukine Interleukine sind Cytokine, die als Kommunikationsproteine von Leukozyten entdeckt wurden.

IL1 β ist die prädominante zirkulierende Isoform von IL1 beim Menschen. IL1 β gilt als proatherogenes Interleukin und wird sowohl von glatten Muskelzellen und Endothelzellen als auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert. IL1 stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, verstärkt die Gefäßpermeabilität und induziert die Proliferation von glatten Muskelzellen. Darüber hinaus fördert IL1 die Blutgerinnung und induziert die Sekretion proinflammatorischer Cytokine aus glatten Muskelzellen sowie aus Monozyten und Makrophagen⁵.

Auch IL6 nimmt über verschiedene Mechanismen an der Atherogenese teil: IL6 wird von Monozyten und Makrophagen sowie von Zellen der betroffenen Gefäße exprimiert. IL6 fördert die endotheliale Dysfunktion, die Proliferation glatter Muskelzellen, die Migration, Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen¹¹⁶. Man geht davon aus, dass IL6 ein Biomarker der Atherosklerose ist¹³³.

Subpopulationen der Monozyten

Definition der Monozytensubpopulationen Die klassischen Monozyten exprimieren das Oberflächenmolekül CD14 (siehe Seite 11) stark, jedoch nicht den FC γ -Rezeptor III, CD16. 1989 wurde erstmals eine Subpopulation von Monozyten, die auch CD16 exprimiert, beschrieben (CD16pos-Monozyten)[?]. Diese werden seit einigen Jahren anhand ihrer CD14-Expression wiederum unterteilt in CD14lowCD16pos-Monozyten und CD14highCD16pos-Monozyten (siehe Abb. 6 auf Seite 32)[?]. Problematisch hierbei ist, dass dieses *Gating* der Monozyten (siehe Abb. 5 auf Seite 31) keinen einheitlichen Regeln folgt und es damit geringfügige Schwankungen zwischen verschiedenen Studien gibt.

Seit einigen Jahren werden die den beschriebenen humanen Monozytensubpopulationen äquivalenten murinen Monozytensubpopulationen untersucht.

Eigenschaften der CD16pos-Monozyten Die meisten Studien beschäftigen sich mit den CD16pos-Monozyten im Allgemeinen. Da diese Eigenschaften von Gewebsmakrophagen zeigen, gelten sie als die reiferen Monozyten. Man betrachtet sie als eine Zwischenstufe zwischen den stark CD14-exprimierenden Monozyten, die kein CD16 exprimieren und den Makrophagen, die weniger CD14, dafür aber CD16 exprimieren¹⁴². Es konnte gezeigt werden, dass auch die Makrophagen, die sich in der atheromatösen Plaque befinden, CD16 exprimieren⁵⁰.

Ein Merkmal der CD14lowCD16pos Monozyten ist, dass sie den MCP1-Rezeptor CCR2 weniger stark exprimieren als klassische Monozyten¹³⁷. Die Expression des Fractalkine-Rezeptors CX3CR1 hingegen ist höher als auf CD16-negativen Monozyten⁴. Inwiefern sich dieser Unterschied auf das tatsächliche Migrationsverhalten der Monozyten auf MCP1 und Fractalkine hin auswirkt, ist noch nicht abschließend geklärt^{3;126}

Die CD16pos Monozyten gelten als proinflammatorische Monozyten. Es gibt Hinweise darauf, dass CD16pos Monozyten für einen Großteil der monozytären TNF α -Synthese verantwortlich sind¹¹. Bei Patienten mit einem hohen Anteil CD16-positiver Monozyten ist die TNF α -Konzentration im Blut erhöht¹¹⁵. Die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 ist in diesen Zellen hingegen vermindert³⁶. Die CD14highCD16pos-Monozyten wiederum gelten als die hauptsächlichen IL-10-Produzenten¹¹⁹ und damit

als eher antiinflammatorisch.

Man vermutet, dass die CD16pos-Monozyten als inflammatorische Monozyten an der Pathogenese der Atherosklerose teilhaben. Wenn sie dies tun, so ist bislang unklar, ob über eigene Migration in atherosklerotische Plaques oder über andere Mechanismen¹⁰⁰.

2.3.3 Atherosklerose und Lipide, insbesondere Triglyceride

Lipide sind hydrophobe Substanzen. Um im Blut transportiert werden zu können, lagern sich verschiedenartige Lipide mit einem variablen Proteinanteil, der aus den sogenannten Apolipoproteinen besteht, zu den sogenannten Lipoproteinen zusammen. Tabelle 1 zeigt ihre Zusammensetzung.

Cholesterin und Lipoproteine

Lipoprotein	Zusammensetzung [%]			Apolipoprotein
	freies Cholesterin	Cholesterinester	Triglyceride	
LDL	7–10	35–40	7–10	B100
HDL	3–4	12	3–5	A–I, A–II
VLDL	5–10	10–15	50–65	B–100, C, E
Chylomikronen	1–3	3–5	84–89	B–48, C, E

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lipoproteine^{58;87}

Das LDL-Cholesterin stellt normalerweise 60-70 % des Gesamtserumcholesterins dar⁸⁷. Durch Oxidation, Glycierung, Aggregation oder andere Prozesse modifiziertes LDL, ist die Hauptursache von Verletzungen des Endothels und der darunter liegenden glatten Muskulatur. Die Aufnahme von oxLDL ist unabdingbar für die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen. Darüber hinaus wirkt modifiziertes LDL als chemotaktischer Reiz für Monozyten. Inflammatorische Mediatoren wie TNF α und IL1 begünstigen die Bindung von LDL an das Endothel und die glatte Gefäßmuskulatur¹⁰⁷. Die Konzentration des LDL-Cholesterins im Serum ist mit dem Risiko, an KHK zu erkranken oder rekurrente kardiovaskuläre Ereignisse zu erleiden, assoziiert⁵⁷. Das LDL-Cholesterin ist daher

das primäre Ziel einer cholesterinsenkenden Therapie. Die Senkung des LDL-Cholesterins durch Statine führt zu einem reduzierten kardiovaskulären Risiko⁸⁷.

Das HDL-Cholesterin stellt üblicherweise 20-30 % des Gesamtserumcholesterins⁸⁷. Seine Konzentration im Serum korreliert invers mit dem kardiovaskulären Risiko. Dabei geht ein niedriges HDL oft mit der Inzidenz anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren einher. Eine Steigerung der Konzentration des HDL-Cholesterins senkt das kardiovaskuläre Risiko⁸⁷.

VLDL wird als Vorläufer von LDL in der Leber produziert. Sein Anteil am Gesamtserumcholesterin liegt bei 10-15 %. Insbesondere den degradierten, cholesterinesterreichen VLDL-Partikeln, den sogenannten VLDL-*remnants*, wird eine proatherogene Wirkung zugeschrieben⁸⁷.

Chylomikronen werden nach Aufnahme einer fettreichen Mahlzeit im Verdauungstrakt gebildet. Ihr Anteil am Serumcholesterin ist nahrungsabhängig und daher variabel. Auch hier wird vor allem den *Remnant*-Partikeln eine proatherogene Rolle zugesprochen⁸⁷.

Triglyceride

Die pathogenetische Rolle der Triglyceride für die Atherosklerose ist unklar. Der prädiktive Stellenwert der Nüchtern-Triglyceridkonzentration im Plasma für das kardiovaskuläre Risiko wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert⁸⁰. Einerseits zeigen viele Studien, dass eine erhöhte Nüchtern-Triglyceridkonzentration im Plasma mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen. Andererseits wird diese Korrelation nach Adjustierung für andere Risikofaktoren, insbesondere für eine niedrige Konzentration des HDL-Cholesterins im Plasma, deutlich abgeschwächt^{127;54;113}. Damit liefert die Triglyceridkonzentration keine zusätzlich zu den über die klassischen Risikofaktoren gewonnene Information bezüglich des kardiovaskulären Risikos. Sie gilt vielmehr als Biomarker der Atherosklerose und nicht als unabhängiger Risikofaktor^{40;80}.

Die Plasmatriglyceridkonzentration unterliegt deutlichen Schwankungen^{53;80}. Insbesondere kommt es zu einem postprandialen Anstieg, der vier bis fünf Stunden nach Nahrungsaufnahme sein Maximum erreicht⁸³. Die aktuellen Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) und der *American Heart Association* (AHA) sehen eine Bestimmung

des Plasmalipidprofils in nüchternem Zustand zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos vor^{127;42;87}. Diese Messung ist jedoch nur für einen kleinen Anteil des Tages repräsentativ und berücksichtigt die postprandial erreichten Triglyceridkonzentrationen nicht⁸⁰.

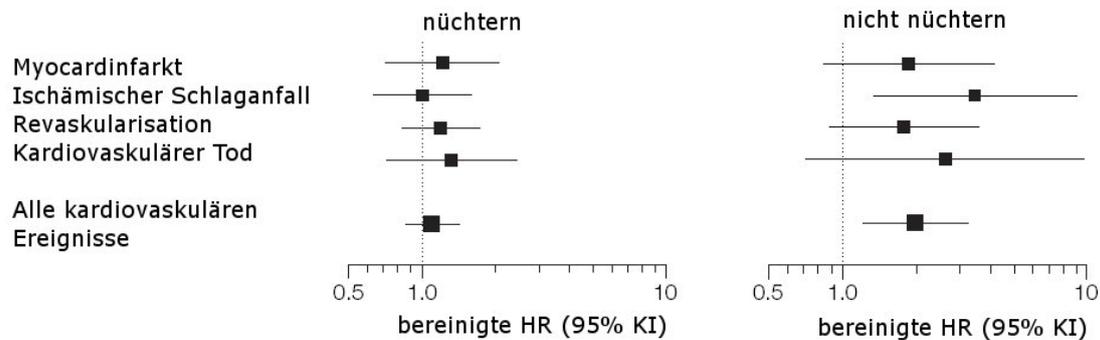


Abbildung 4: *Women's Health Study*: Die postprandialen Triglyceride korrelieren mit dem kardiovaskulären Risiko⁷

Im Rahmen der „*Women's Health Study*“ wurde festgestellt, dass die Plasmatriglyceridkonzentration von Frauen nach einer mindestens achtstündigen Nüchternphase keinen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt. Bei Frauen, die sich in einem maximal achtstündigen postprandialen Zustand befinden, stellt die Plasmatriglyceridkonzentration einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar (siehe Abb. 4). Dabei ist die Aussagekraft am höchsten, wenn die Mahlzeit zwischen zwei und vier Stunden zurückliegt^{7;83}. Die „*Copenhagen City Heart Study*“ zeigt für beide Geschlechter eine Korrelation zwischen der postprandialen Triglyceridkonzentration im Plasma und der kumulativen Inzidenz von Myokardinfarkt, ischämischer Herzkrankheit und Tod⁹⁰.

Im Rahmen *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT) wurde hingegen eine ähnliche prädiktive Aussagekraft der nüchternen und postprandialen Triglyceridkonzentration für das kardiovaskuläre Risiko gefunden³³.

Die Erkenntnisse der „*Women's Health Study*“ und der „*Copenhagen City Heart Study*“ legen nahe, dass die postprandiale Triglyceridkonzentration im Plasma eine atherogen-

tische Rolle spielt und Rückschlüsse auf das kardiovaskuläre Risiko zulässt. Diese These wird durch Studien gestützt, die den Zusammenhang zwischen postprandialer Triglyceridämie und klinischen Manifestationen der Atherosklerose betrachten. So konnte gezeigt werden, dass die postprandiale Triglyceridkonzentration mit der Intima–Media–Dicke der Arteria carotis communis korreliert¹¹⁸.

Weder in der „*Women’s Health Study*“ noch in der „*Copenhagen City Heart Study*“ erfolgte eine randomisierte Bestimmung der nüchternen und postprandialen Triglyceride. Die Mahlzeiten, welche die Probanden vor der Blutentnahme zu sich nahmen, unterlagen keiner Kontrolle.

Die *Homburg Cream and Sugar–Study* (HCS–Studie) untersucht prospektiv die Bedeutung postprandialer Triglyceride für das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Hierzu wurde ein standardisierter oraler Triglyceridtest entwickelt (siehe S.28). Dieser wurde bei 514 konsekutive Patienten mit klinisch stabiler angiographisch dokumentierter KHK durchgeführt¹³⁹.

2.4 Fragestellung der Arbeit

Inwiefern sich die postprandiale Triglyceridämie auf monozytäre und andere proatherogene inflammatorische Prozesse auswirkt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die vorliegende Arbeit geht folgenden Fragen nach:

- Reagieren gesunde Probanden mit Veränderungen von monozytären und anderen inflammatorischen proatherogenen Markern auf die orale Aufnahme eines Testgetränks, das reich an Triglyceriden ist und keine Glucose enthält? Wie ist im Unterschied dazu die Reaktion auf die Aufnahme von Wasser im Sinne einer Negativkontrolle?
- Reagieren KHK–Patienten (Teilnehmer der HCS–Studie) anders als gesunde Probanden auf die Aufnahme eines triglyceridreichen, glucosefreien Testgetränks was monozytäre und andere inflammatorische proatherogene Marker betrifft?

3 Material, Probanden und Methoden

3.1 Material

Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-human CCR2-Allophycocyanin Clone 48607	R&D Systems, Mineapolis, USA
Mouse anti human CD11b:FITC Clone ICRF44	AbD Serotec, Martinsried
Mouse anti human CD14:APC, Clone UCHM1	AbD Serotec, Martinsried
Mouse anti human CD16:RPE, Clone 3G8	AbD Serotec, Martinsried
Mouse anti human CD16:RPE, Clone 3G8	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FITC labeled Anti-human CX3CR1 Clone 2A9-1	Medical and Biological Laboratories Co.,LTD. Naka-ku Nagoya, Japan

Kits

Produkt	Hersteller
READY-SET-GO!Human CCL2/MCP1/MCAF	eBioscience, NatuTec, Frankfurt
Quantikine Human CX3CL1/Fractalkine	R&D Systems, Mineapolis, USA
Dynal Monocyte Negative Isolation Kit	Dyanal, invitrogen, Karlsruhe
Absolutely RNA Microprep Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Quantikine Human sICAM-1/CD54 Immunoassay	R&D Systems, Mineapolis, USA
Quantikine HS Human TNF- α /TNFSF1A	R&D Systems, Mineapolis, USA

Medien, Lösungen, Puffer

Produkt	Zusammensetzung /Hersteller
FACS-Puffer	1xPBS 5 % FCS 0,5 %BSA 0,07 % Natriumazid steril filtriert
Isolationspuffer	1xPBS 0,1 % BSA 0,6 % Natriumcitrat
PBS	A.dest 8g/l NaCl 0,2g/l KCl 1,44g/l Na ₂ HPO ₄ 0,24g/l KH ₂ PO ₄ pH=7,4
RPMI 1640	invitrogen, Karlsruhe
Stop Solution MCP1	1M H ₃ PO ₄
Waschpuffer MCP1	1xPBS 0,05 % Tween

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
Albumin bovin Fraction V pH7	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BD FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
di-Kaliumhydrogenphosphat	VWR International, Darmstadt
Dimethyl sulfoxide, minimum 99,5 %GC	Sigma-Aldrich Chemie, München
DNase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
DNase I, RNase-free	Roche, Karlsruhe
Ethanol absolute for analysis	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid >99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
LPS	Sigma-Aldrich Chemie, München
LSM 1077 Lymphocyte	PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Natriumchlorid >99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Primer Random p(DN)s	Roche, Mannheim
RNasin RNase-Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	peqLab Biotechnologie, Erlangen
tri-Natrium-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Türk's Lösung für Leukozytenzählung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Wasser, vollentsalzt und destilliert	Braun

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
CryoPure Röhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht
MicroAmp FastOptical 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
S-Monovette 2,7 ml K3E 1,6 mg EDTA	Sarstedt AG, Nümbrecht
S-Monovette 7,5 ml LH 19 I.E./ml Blut	Sarstedt AG, Nümbrecht
S-Monovette 4,7 ml Z-Gel	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zellkulturtestplatte 6	Techno Plastic Products, Schweiz

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Geräte und Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Centrifuge Napco 2019R	Napco, Winchester, VA, USA
DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
DynaMag-15 Magnetic Particle Concentrator	invitrogen, Karlsruhe
ELISA reader Model 550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
FACSCalibur TM	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Hera cell 150	Heraeus Holding, Hanau
Hera safe KS12	Heraeus Holding, Hanau
Labofuge 400R	Heraeus Holding, Hanau
Megafuge 1.OR Centrifuge	Heraeus Holding, Hanau
Olympus CK2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Primer für *realtime* PCR

Produkt und Sequenz	Hersteller
18–S:	
for:TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
rev:CGA TCC GAG GGC CTA ACTA	
hsMCP1:	
for:GCC TCC AGC ATG AAA GTC TC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
rev:CAG ATC TCC TTG GCC ACA AT	
hsIL1β:	
for:GGA CAA GCT GAG GAA GAT GC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
rev:TCC ATA TCC TGT CCC TGG AG	
IL6:	
for:ATG CAA TAA CCA CCC CTG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
rev:GAG GTG CCC ATG CTA CAT TT	
hsTNFα:	
for:ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATCC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
rev:GAG GGC TGA TTA GAG AGA GGTC	

3.1.1 Auswertungs- und Statistikprogramme

- Microsoft® Exel 2002
- StepOne™Software v2.0 für PCR
- BD Cell Quest™Pro
- SPSS 18.0 German

3.2 Charakterisierung des Probandenkollektivs

Die Probanden, die an der Studie teilnahmen, lassen sich in folgenden Gruppen einteilen:

- Gruppe „Gesunde oTT“: 23 gesunde Probanden, die einen oTT durchführten
- Gruppe „Gesunde nüchtern“: 10 Teilnehmer aus Gruppe „Gesunde oTT“, die als Negativkontrolle fungierten
- Gruppe „KHK oTT“: 30 Patienten mit stabiler KHK, die im Rahmen der HCS-Studie einen oTT durchführten

Diese Gruppen werden im Folgenden näher charakterisiert.

Der Effekt von Triglyceriden wurde an einer Gruppe von 23 Probanden ohne bekannte Krankheiten untersucht. Insbesondere galten kardiovaskuläre Erkrankungen, maligne Erkrankungen sowie akute oder chronische inflammatorische Erkrankungen als Ausschlusskriterien. Darüber hinaus wurde keine Patienten mit Fettresorptions-, Fettstoffwechselstörungen und Laktoseintoleranz in die Studie eingeschlossen. Um entzündliche Prozesse auszuschließen wurde die CRP-Konzentration im Serum zum Zeitpunkt $t=0$ h ermittelt. Bei 12 der 23 Probanden lag sie unterhalb der Nachweisgrenze ($<0,6$ mg/dl). Für diese Probanden wurde eine CRP-Konzentration von $0,3$ mg/dl angenommen. Unter dieser Voraussetzung lag der Median bei $0,6$ mg/dl (Interquartilenabstand: $[0,3$ mg/dl – $0,9$ mg/dl]).

Als Negativkontrolle diente eine Gruppe, die sich aus zehn Teilnehmern der Gruppe „Gesunde oTT“ zusammensetzte. Wieder wurde die CRP-Konzentration im Serum zum Ausschluss eines inflammatorischen Prozesses ermittelt. Diese lag bei sechs der Probanden mit $<0,6$ mg/dl unterhalb der Nachweisgrenze. Wiederum wurde hier eine CRP-Konzentration von $0,3$ mg/dl angenommen. So ergab sich ein Median von $0,3$ mg/dl (Interquartilenabstand: $[0,3$ mg/dl – $1,25$ mg/dl]).

Des Weiteren wurde an 30 Teilnehmern der *Homburg Cream and Sugar-Study* der Effekt postprandialer Triglyceride untersucht. Einschlusskriterium für diese Probanden war die koronarangiographisch gesicherte Diagnose einer symptomatischen KHK - unabhängig von einer erfolgten Intervention - und ein Stenosegrad in mindestens einem Koronar-

gefäß von nicht weniger als 40 %. Die gering stenosierten Ein-Gefäß-Erkrankungen unter 60 % stellten die absolute Ausnahme dar, so dass eine überdimensionale Streuung der Patienten den Schweregrad der KHK betreffend vermieden wurde.

Als definitives Ausschlusskriterium galt eine geplante oder in den letzten sechs Wochen durchgeführte Bypass-Operation, ein weniger als vier Wochen zurückliegender Herzinfarkt, das Vorliegen einer dekompensierten schweren Herzinsuffizienz der NYHA-Klasse IV in Verbindung mit Ruhedyspnoe oder einer Ejektionsfraktion von unter 20 %. Ebenfalls ausgeschlossen blieben Patienten mit endokrinologischen Krankheitsbildern wie einer unbehandelten Hyperthyreose und Patienten mit Erkrankungen, welche mit einer Fettresorptions-, Fettassimilations- oder Fettstoffwechselstörung einhergehen, Laktoseintoleranz, schweren Leber- und Nierenfunktionstörungen, malignen Grunderkrankungen sowie chronischem Alkoholabusus.

3.3 Methoden

3.3.1 Der orale Triglyceridtoleranztest

Um die Effekte postprandialer Triglyceride auf proatherogene Parameter messen zu können, wurde ein oraler Triglyceridtoleranztest (oTT) eingesetzt. Dieser Triglyceridtoleranztest wurde im Rahmen der HCS-Studie entwickelt¹³⁹ und wird wie folgt durchgeführt: Am Untersuchungstag nimmt der Proband in nüchternem Zustand 250 ml flüssige Schlagsahne ohne den Zusatz weiterer Stoffe zu sich. Dabei wird Sahne mit einem hohen Fettanteil von 30-32 % (hier: Marke „Landliebe“) verwendet. Tabelle 3 zeigt ihre Zusammensetzung. Laut Herstellerangaben ist das Fettsäurespektrum der Milch abhängig von der Fütterungsart der Kuh, die durch jahreszeitliche Begebenheiten bestimmt und dadurch variabel ist. Die angegebenen Kohlenhydratkonzentration wird durch die in der Milch vorkommenden Laktose gebildet. Der Zusatz des Stabilisators Carrageen, welcher ein Aufrahmen der Sahne vermeiden soll, hat keinen Einfluss auf die Kohlenhydratkonzentration der Sahne. Carrageen ist die einzige beigesetzte Zutat. Der Fettgehalt unterliegt Schwankungen zwischen 31,9 g/100 ml und 32,5 g/100 ml, welche für die Testergebnisse des

oTT für unerheblich angesehen wird. Auch Schwankungen in der Eiweißzusammensetzung in Abhängigkeit von der Laktationsperiode werden als irrelevant betrachtet.

Unmittelbar vor der Aufnahme der Sahne erfolgt eine erste Blutentnahme, die der Ermittlung von Basisparametern dient. Der Zeitpunkt dieser ersten Blutentnahme wird als Zeitpunkt $t=0$ h definiert. Es folgen weitere Blutentnahmen zu den Zeitpunkten $t=3$ h und $t=5$ h. Diese dienen der Untersuchung der postprandialen Effekte. Im Zeitraum zwischen $t=0$ h und $t=5$ h nimmt der Proband keine kalorien- oder koffeinhaltigen Speisen oder Getränke zu sich. Ausschließlich Wasser darf in dieser Zeit getrunken werden.

Im Sinne einer Negativkontrolle fanden sich zehn der Probanden an einem weiteren Tag ein, um das Testprotokoll dahingehend modifiziert zu durchlaufen, dass sie nun statt Sahne Wasser zu sich nahmen.

Durchschnittliche Nährwerte	pro 100 g / 100 ml
Brennwerte	1276 kJ / 310 kcal
Eiweiß	2,3 g
Kohlenhydrate	3,1 g
davon Zucker	3,1 g
Fett	32,0 g
davon gesättigte Fettsäuren	21,0 g
Ballaststoffe	0,0 g
Natrium	0,04 g

Tabelle 3: Zusammensetzung von Schlagsahne der Marke „Landliebe“

3.3.2 Lipidprofil, Blutbild, Differentialblutbild, CRP

Das Lipidprofil (Triglyceride, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin), das Blutbild, das Differentialblutbild, die Glucosekonzentration im Plasma sowie der CRP-Spiegel im Plasma wurden in der Routinediagnostik des Universitätsklinikums des Saarlandes ermittelt. Tabelle 4 auf der nächsten Seite führt die in der Routinediagnostik verwendeten Methoden auf. Die Konzentration des LDL-Cholesterins wurde mit Hilfe der Friedewaldformel

$$LDL\text{-Cholesterin} = \text{Gesamtcholesterin} - HDL\text{-Cholesterin} - \frac{\text{Triglyceride}}{5}$$

errechnet. Dabei geht man davon aus, dass ein Fünftel der Triglyceridkonzentration der Konzentration an VLDL-Cholesterin entspricht. Ab einer Triglyceridkonzentration > 400 mg/dl liefert die Friedewaldformel keine zuverlässigen Ergebnisse mehr.

Parameter	Messtechnik	Gerät
Glucose	Hexokinase	Modular
Cholesterin	CHOD-PAP (cholesterol oxidase-p-aminophenazone)	Modular
HDL-Cholesterin	Enzymatischer Test (HDL-C plus 3. Gen.)	Modular
Triglyceride	GPO-PAP (glycerol phosphate oxidase-p-aminophenazone)	Modular
CRP	Turbidimetrie	Modular
Blutbild		Sysmex XE 5000
Differentialblutbild		Sysmex XE 5000

Tabelle 4: In der Routinediagnostik verwendete Methoden

3.3.3 Durchflusszytometrie

Technik der Durchflusszytometrie von Leukozyten

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Methode, die simultan verschiedene Eigenschaften von Zellen, nämlich ihre relative Größe, ihre relative Granularität sowie ihre spezifische Fluoreszenz misst. Dazu werden suspendierte Zellen an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet.

Über die Lichtbeugung, die entlang der Achse des einfallenden Lichts gemessen wird (Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*, FSC) wird die relative Größe der Zellen erfasst. Die Lichtbrechung wird im 90° -Winkel zum einfallenden Licht gemessen (Seitwärtsstreulicht,

sideward scatter, SSC) und gibt Auskunft über die Zellkomplexität und –granularität. Anhand dieser Parameter können Leukozyten aus lysiertem Vollblut derart dargestellt werden, dass zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterschieden werden kann (siehe Abb. 5).

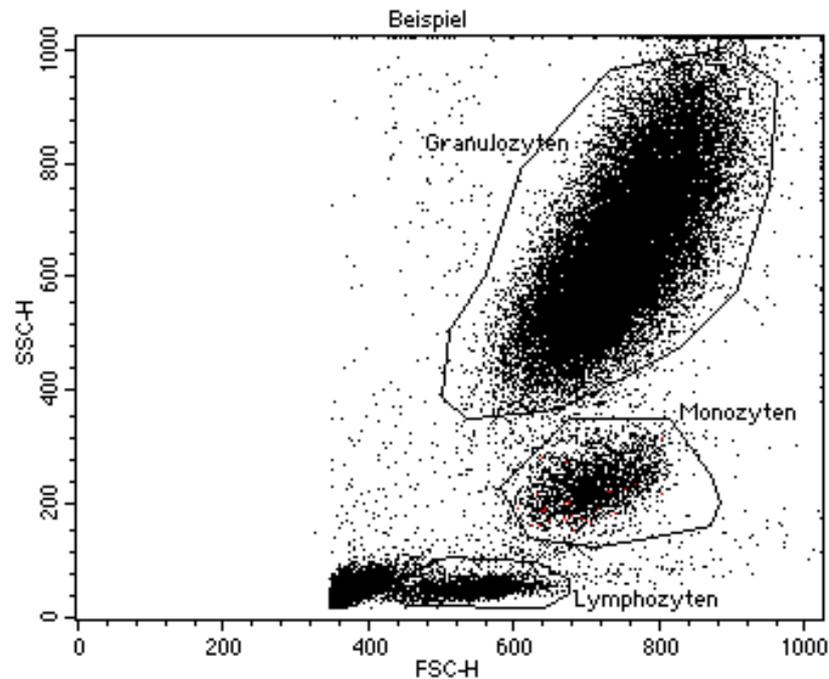


Abbildung 5: *Gating* von Leukozyten im durchflusszytometrischen *Scatterplot*

Die Möglichkeit der Messung spezifischer Fluoreszenz nutzt man zur relativen Quantifizierung von Oberflächenmolekülen. Als Grundlage dafür dient eine Antigen–Antikörper–Reaktion, wobei der Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet und mit einem Fluorochrom markiert ist. Antikörper, die an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind, können simultan verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die Fluorochrome FITC, PE und APC genutzt. In der Durchflusszytometrie werden die Elektronen der Fluorochrome zunächst durch einen monochromatischen Laserimpuls auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Puls fallen sie wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Dabei wird Energie in Form von Photonen frei. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Sie wird als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. In dieser Arbeit wurde die

Expression der Oberflächenmoleküle CD11b und CD14 als Indikator monozytärer Aktivierung bestimmt. Darüberhinaus wurde die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 untersucht.

Anhand spezifischer Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen ist es möglich, Subpopulationen von Zellen zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Coexpression von CD14 und CD16 auf Monozyten untersucht. Dabei wurden folgende Subpopulationen von Monozyten betrachtet: Diejenigen Monozyten, die CD16 und wenig CD14 exprimieren („CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten“), diejenigen Monozyten, die CD16 und viel CD14 exprimieren („CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten“) sowie die Gesamtheit der CD16-exprimierenden Monozyten („CD16^{pos}-Monozyten“), welche die Summe der beiden erstgenannten Subpopulationen darstellt (siehe Seite 16 und Abb. 6). In der vorliegenden Studie wird der prozentuale Anteil der jeweiligen Subpopulation an der Gesamtheit der CD14-exprimierenden Monozyten betrachtet.

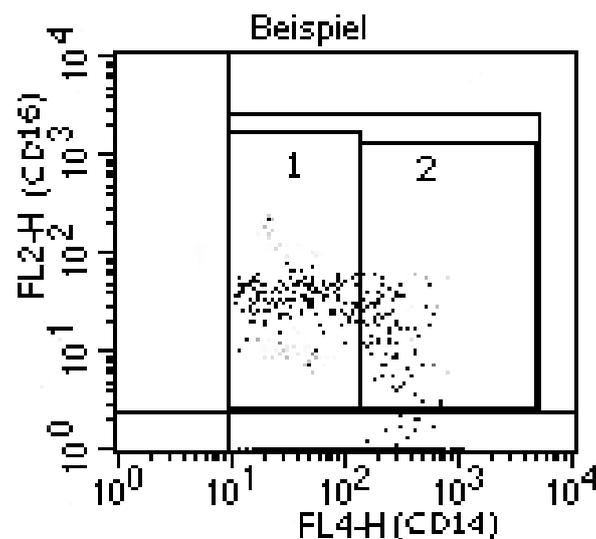


Abbildung 6: *Gating* der Monozytensubpopulationen:
CD16^{pos} Monozyten: rechte oberer Quadrant
CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten: Feld 1
CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten: Feld 2

Anfärbung von Oberflächenmolekülen

Zunächst werden 50 μ l Vollblut, das mittels EDTA antikoaguliert ist, spätestens 15 min nach Entnahme mit 2 ml FACS-Puffer vermischt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 4 °C und 400 g über 3 Minuten. Anschließend wird der Überstand komplett abgesaugt. Nun werden die Zellen mit 50 μ l eines Antikörpergemisches (Tabelle 5) durchmischt und 45 Minuten lang im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Antikörper (Fluorchrom)	Volumen [μ l] pro 50 μ l Vollblut
Anti-CD11b (FITC)	5
Anti-CD14 (APC)	4
Anti-CD16 (PE)	2,5
FACS-Puffer	ad 50 μ l
Anti-CCR2 (FITC)	5
Anti-CD14 (APC)	4
Anti-CD16 (PE)	2,5
FACS-Puffer	ad 50 μ l
Anti-CX3CR1 (FITC)	20
Anti-CD14 (APC)	4
Anti-CD16 (PE)	2,5
FACS-Puffer	ad 50 μ l

Tabelle 5: Verwendete Antikörpergemische für die FACS-Färbung

Danach wird 1 ml 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnte FACS-Lysing-Solution zugegeben und mit den gefärbten Zellen vermischt. Die FACS-Lysing-Solution enthält Diethylenglycol, so dass die Erythrozyten während einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leicht hypotonen Bedingungen lysiert werden. Danach gibt man 1 ml FACS-Puffer zu, mischt und zentrifugiert 3 min bei 4 °C und 400g. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und es folgt ein Waschschrift, bei dem 2 ml FACS-Puffer mit dem Pellet gemischt werden. Wiederum wird wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die Zellen werden in 200 μ l FACS-Puffer resuspen-

diert. Nun kann die Messung am FACS-Gerät (FACSCalibur Becton Dickinson) erfolgen. Während der beschriebenen Prozedur ist darauf zu achten, dass die Proben immer (außer während der Erythrozytenlyse) auf Eis aufbewahrt werden und der FACS-Puffer stets gekühlt ist. Des Weiteren sind Fluorochrome vor Licht zu schützen.

3.3.4 Experimente an isolierten Monozyten

Isolation

Die Isolation von Monozyten aus Vollblut erfolgt, indem zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen (PBMCs) gewonnen werden. Anschließend werden alle Zellen, die keine Monozyten sind, mittels magnetischer Partikel (*Dynabeads*) entfernt. Diese sind an Antikörper gebunden, die speziell gegen Antigene gerichtet sind, die sich nicht auf Monozyten, wohl aber auf anderen mononukleären Zellen, Granulozyten oder Erythrozyten befinden. Es handelt sich also um eine Negativisolation von Monozyten.

Zur Dichtegradientenzentrifugation wird mittels Heparin antikoaguliertes Vollblut unmittelbar nach Entnahme 1:1 mit eiskaltem PBS verdünnt. Von diesem Gemisch werden je 30 ml vorsichtig auf 15 ml Separationslösung (LSM 1077 Lymphocyte) geschichtet. Dabei handelt es sich um ein Medium aus hydrophilen Polymeren der Dichte $D=1,007$ g/ml (bei 20 °C). Das Medium und das verdünnte Blut bilden zwei Phasen, die sich nicht vermischen sollen. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 15 °C und 800 g, die ohne Bremse beendet wird. Nun sind vier Phasen sichtbar: Erythrozyten und Granulozyten, Separationslösung, ein sogenannter *buffy coat*, der die mononukleären Zellen enthält und Plasma. Ziel ist es, nun den *buffy coat* abzupipettieren und in ein neues Reaktionsbehältnis zu überführen. Es folgen zwei Waschschriffe, bei denen zunächst PBS zugegeben und dann bei 4 °C und 300 g 8 min lang zentrifugiert wird. Der Überstand wird jeweils verworfen. Nach dem zweiten Waschschriff wird das Pellet, das die isolierten PBMCs enthält, in 1 ml Isolationspuffer (siehe Absatz 3.1) resuspendiert. Davon werden 10 µl zunächst in PBS und anschließend in Türk's Lösung je 1:10 verdünnt. Diese 1:100-verdünnte Lösung dient zum Zählen der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Die im Folgenden beschriebene Monozytenisolation erfolgt mit Hilfe eines Isolationskits (siehe Absatz 3.1). Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Menge von 10^7 PBMCs. Man gibt zu den in 1 ml Isolationspuffer suspendierten Zellen 20 μ l Blockreagenz und 20 μ l Antikörpergemisch und lässt 20 min bei 4 °C inkubieren. Dabei wird die Probe geschüttelt. Die Probe wird anschließend mit 2 ml Isolationspuffer gewaschen und 8 min lang bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 100 μ l Dynabeadlösung und 900 μ l Isolationspuffer gemischt und bei 4 °C 15 min lang inkubiert. Dabei wird die Probe wieder geschüttelt. Anschließend wird 1 ml Isolationspuffer dazugegeben. Die Probe wird für 2 min in den Magneten gestellt. Währenddessen werden die Zellen, an die Magnetpartikel gebunden sind, aus der Lösung gezogen und bleiben am Rand des Reaktionsgefäßes haften. Der Überstand enthält die negativ-isolierten Monozyten. Er wird vorsichtig mit einer serologischen Pipette in ein anderes Gefäß überführt. Die verbleibenden Magnetbeads werden wieder mit 1 ml Isolationspuffer gut vermischt und für 2 min in den Magneten gestellt. Abermals wird der Überstand vorsichtig abpipettiert und zu dem ersten Überstand gegeben. Dieses Gemisch wird 5 min bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet, das die negativisolierten Monozyten enthält, wird unabhängig von der Anzahl der PBMCs in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert. Davon werden 10 μ l 1:10 mit Türk's Lösung verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Stimulation

Die Stimulation erfolgt, um mögliche dezente inflammatorische Prozesse zu extrapolieren. Hierzu werden die wie oben beschrieben isolierten Monozyten (2×10^6 Zellen in je 1 ml RPMI 1640 incl. 10 % FCS) in eine Zellkulturschale gegeben und über drei Stunden mit 10 ng LPS/ml bei 37 °C stimuliert.

Nach der Inkubation wird der Überstand abpipettiert. Die in der Zellkulturschale verbleibenden Zellen werden lysiert und der Prozedur der RNA-Isolation zugeführt.

RNA–Isolierung

Um die mRNA aus Monozyten zu erhalten, isoliert man die Gesamt–RNA sowohl aus nativen als auch aus stimulierten negativisierten Monozyten (siehe S. 34).

Die RNA–Isolation wird mit Hilfe des Absolutely RNA Microprep Kit (siehe Absatz 3.1) durchgeführt. Zur Lyse werden zunächst 10^5 Zellen in $100\ \mu\text{l}$ Lysepuffer mit $0,7\ \mu\text{l}$ β –Mercaptoethanol aufgenommen und 1 min lang mit einer Pipette vermischt. Die so entstandenen Zellysate werden bei $-80\ ^\circ\text{C}$ gelagert. Die weiteren Arbeitsschritte der RNA–Isolation erfolgen nach dem Prinzip der Spin–Column–Technik .

Die isolierte RNA wird bei $280\ \text{nm}$ photometrisch quantifiziert. Die Reinheit der RNA wird durch das Verhältnis der optischen Dichte bei $260\ \text{nm}$ zur optischen Dichte bei $280\ \text{nm}$ bestimmt.

Reverse Transkription

Um die cDNA der aktuell exprimierten Gene aus der isolierten RNA zu gewinnen, bedient man sich des Prinzips der reversen Transkription. Das bedeutet, dass man eine DNA–Synthese ermöglicht, bei der RNA als Matrize dient. Dazu benötigt man einen Primer, der jegliche RNA amplifizieren kann (*random–primer*), Triphosphate von Nucleinsäuren, den RNase–Inhibitor RNAsin und das Enzym Reverse Transkriptase.

Die wie oben beschrieben gewonnene RNA wird mit Hilfe des Omniscript RT Kits (siehe Absatz 3.1) in cDNA umgeschrieben. Dabei wird die RNA zunächst mit sterilem destilliertem Wasser auf eine Konzentration von $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Davon werden $12\ \mu\text{l}$ zur reversen Transkription eingesetzt. Diese werden mit $8\ \mu\text{l}$ Mastermix (siehe Tab.6) versetzt und dann 1 h im Wasserbad bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. In dieser Zeit findet die reverse Transkription statt. Anschließend werden die Proben bei $93\ ^\circ\text{C}$ für 5 min auf ein Metallblockthermostat gestellt, bevor sie bei $-20\ ^\circ\text{C}$ eingefroren werden.

Real–time–PCR

Die *real–time–PCR* ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht. Zusätzlich bietet sie die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung auch während der Amplifizierung (*real–time*) mittels Fluoreszenzmessung.

Reagenz	Volumen/Probe [μ l]
10x Buffer RT	2
dNTP-Mix (5mM)	2
Random Primer	2
RNAsin	1
Omniscript RT	1

Tabelle 6: Master-Mix für reverse Transkription

Um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren, wird die cDNA zur Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Das bedeutet, dass sie mit zwei für das nachzuweisende Genprodukt spezifischen Primern (*forward* und *reverse*), Nucleotidtriphosphaten und einer thermostabilen DNA-Polymerase versetzt wird. Durch Erhitzen (95 °C) werden die Stränge der cDNA getrennt. Bei der sogenannten *annealing*-Temperatur hybridisieren die Primer mit der Einzelstrang-cDNA und es kommt zur DNA-Synthese. Es folgen Zyklen aus Erhitzen und Abkühlen, wodurch sich der beschriebene Vorgang wiederholt. So wird das untersuchte DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt.

Um die DNA zu quantifizieren, nutzt man SYBR-Green, einen Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA-Doppelsträngen interkaliert. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur Menge doppelsträngiger DNA an. Um aus der Fluoreszenz eine relative Konzentration abzuleiten, bedient man sich einer Verdünnungsreihe eines cDNA-Gemischs aus Proben unbekannter Konzentration. Um die Expression des untersuchten Gens quantitativ einzuordnen, muss man seine relative Konzentration in Relation zur relativen Konzentration eines sogenannten *housekeeping*-Gens setzen. Das ist ein Gen, das konstitutiv exprimiert wird. Es wird nicht reguliert. Das *housekeeping*-Gen, im Fall dieser Arbeit das Gen für 18S-rRNA, dient als interner Standard.

Bei der Untersuchung regulierter Gene (IL6, IL1 β , TNF- α und MCP-1) wurden 1:10 verdünnte cDNA-Proben eingesetzt, bei der Untersuchung des *housekeeping*-Gens (18S-rRNA) 1:100 verdünnte cDNA-Proben. Je 3 μ l der verdünnten Probe werden mit 22 μ l Mastermix (siehe Tab.7) in eine *96-well*-Platte pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation

Reagenz	Volumen/Probe [μ l]
steriles destilliertes Wasser	13,5
Primer forward (1:20 verdünnt)	0,5
Primer reverse (1:20 verdünnt)	0,5
SYBR-Green	7,5

Tabelle 7: Master Mix für *real-time*-PCR

bei 300 Umdrehungen/min über 1 min. Die PCR wird in 45 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95 °C und zu 60 Sekunden bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt.

3.3.5 *Enzyme linked immunosorbent assay*(ELISA)

ELISA ist eine Methode zum quantitativen Nachweis eines bestimmten Proteins. Hierzu benötigt man zwei Antikörper, die beide selektiv an ein Antigen des nachzuweisenden Proteins binden. Der sogenannte *coating*-Antikörper wird fest an eine Mikrotiterplatte (*96-well-plate*) gebunden. Die Probe wird in die Vertiefungen der Platte gegeben. Während einer Inkubation bindet das Antigen in der Probe an den *coating*-Antikörper. Ungebundene Reste der Probe werden in einem anschließenden Waschschritt entfernt. Nun werden die Proben mit einem spezifischen Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, inkubiert. Wieder werden ungebundene Anteile durch Waschen entfernt. Nun wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Die optische Aktivität des entstandenen Reaktionsproduktes kann gemessen werden. Zur Quantifizierung bedient man sich einer Standardkurve aus einer Messserie von Proben bekannter Konzentration, die immer gleichzeitig auf derselben Platte wie die zu analysierenden Proben gemessen werden.

In dieser Arbeit wurde Serum zum ELISA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe von Testkits (siehe Absatz 3.1).

3.3.6 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Messwerte für Triglyceride sowie für die Parameter des Differentialblutbildes wurden die absoluten Messwerte betrachtet.

Im Gegensatz dazu wurden die Messwerte der durch Durchflusszytometrie, ELISA und PCR erhobenen Daten jeweils relative zum Ausgangswert betrachtet. Das heißt, es wurde Quotient aus dem entsprechenden Messwert und dem Messwert zum Zeitpunkt $t=0$ h desselben Probanden gebildet.

In der statistischen Auswertung kamen folgende Methoden zum Einsatz:

- Um die Werte der gemessenen Parameter zwischen zwei Gruppen zu vergleichen, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t -Test eingesetzt.
- Um absolute Messwerte zu zwei Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe zu beurteilen, wurde ein gepaarter zweiseitiger t -Test eingesetzt.
- Um einen Wert eines Parameters in Relation zum Ausgangswert zu beurteilen, wurde der Wilcoxon-Test eingesetzt. In diesem Falle wurden alle Messwerte im Verhältnis zum Messwert zum Zeitpunkt $t=0$ h betrachtet.
- Um die Werte eines Parameters im Verlauf von drei Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe zu beurteilen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) eingesetzt. Um die Werte der Messzeitpunkte $t=3$ h und $t=5$ h mit den Werten zum Zeitpunkt $t=0$ h zu vergleichen, wurde eine Dunnett-post-hoc-Test durchgeführt.
- Um zu prüfen, ob die Werte zweier Parameter miteinander korrelieren, wurde ein Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet.

Bei der Ergebnisdarstellung werden quantitative Parameter in der Form „Mittelwert \pm Standardfehler (SE)“ angegeben. Der Standardfehler wird in Diagrammen in Form eines Balkens angegeben. Signifikante Veränderungen werden in Diagrammen wie folgt gekennzeichnet:

$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***

Ist $p > 0,05$, so gilt ein Testergebnis als nicht-signifikant.

Die Anzahl n der in die Statistik eingegangen Werte, entspricht, sofern nicht anders angegeben, der jeweiligen Grundgesamtheit.

4 Ergebnisse

4.1 Gesunde Probanden (oTT und nüchtern)

4.1.1 Grundcharakteristika

Charakteristikum	Mittelwert \pm SE
Alter	26,43 \pm 1,06 Jahre
Geschlecht	48 %männlich; 52 %weiblich
Größe	1,74 \pm 0,03 m
Gewicht	70,00 \pm 2,76 kg
BMI	23,03 \pm 0,62 kg/m ²
BSA	1,83 \pm 0,05 m ²
Gesamtcholesterin	182,3 \pm 7,64 mg/dl
HDL	63,17 \pm 3,93 mg/dl
LDL	105,3 \pm 6,34 mg/dl

Tabelle 8: Gruppe „Gesunde oTT“

Charakteristikum	Mittelwert \pm Standardfehler
Alter	25,8 \pm 1,66 Jahre
Geschlecht	60 %männlich; 40 %weiblich
Größe	1,78 \pm 0,04 m
Gewicht	73,7 \pm 5,06 kg
BMI	22,96 \pm 1,06 kg/m ²
BSA	1,9 \pm 0,09 m ²
Gesamtcholesterin	167,7 \pm 6,34 mg/dl
HDL	59,7 \pm 5,07 mg/dl
LDL	95,2 \pm 6,47 mg/dl

Tabelle 9: Gruppe „Gesunde nüchtern“

4.1.2 Lipidprofil

Bei den gesunden Probanden der Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ wurde ein Lipidprofil zu den Zeitpunkten $t=0$ h, $t=3$ h und $t=5$ h erstellt. Die Konzentration der Triglyceride im Plasma der Probanden aus Gruppe I, die einen oTT durchführten, lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $89,7 \pm 8,05$ mg/dl. Zum Zeitpunkt $t=3$ h lag der Plasmatriglyceridspiegel bei $155,48 \pm 13,31$ mg/dl, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $130,65 \pm 12,3$ mg/dl. Das entspricht einem Anstieg auf 177 ± 9 % nach 3 h und einem anschließenden Rückgang auf 155 ± 12 % des Ausgangstriglyceridspiegels nach 5 h.

In Gruppe „Gesunde nüchtern“, die als Negativkontrolle fungierte und daher keinen oTT durchführte, lag die Triglyceridkonzentration im Plasma zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $82,5 \pm 10,49$ mg/dl, zum Zeitpunkt $t=3$ h bei $78,0 \pm 9,93$ mg/dl und zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $77,6 \pm 9,36$ mg/dl. Gruppe II zeigt also keine statistisch signifikante Veränderung der Triglyceridkonzentration im Plasma (siehe Abb. 7).

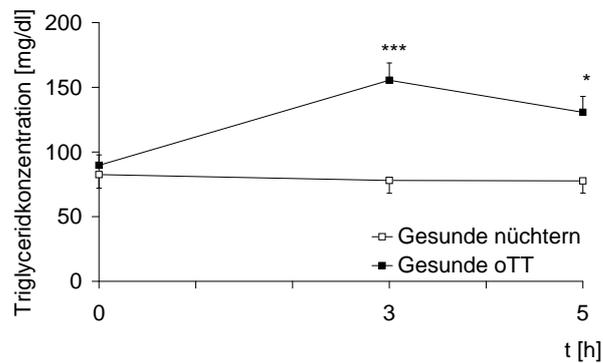


Abbildung 7: Die Triglyceridkonzentration steigt in der Gruppe „Gesunde oTT“ signifikant an ($p < 0,005$).

In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ bleibt sie unverändert.

In Gruppe „Gesunde oTT“ lag zum Zeitpunkt $t=0$ h die Konzentration des Gesamtcholesterins im Plasma bei $182,3 \pm 7,64$ mg/dl. Dabei betrug die Konzentration des LDL-

Cholesterins $105,3 \pm 6,34$ mg/dl und die des HDL-Cholesterins $63,17 \pm 3,93$ mg/dl. Sowohl die Konzentration des Gesamtcholesterins als auch die Konzentrationen des LDL-Cholesterins und des HDL-Cholesterins waren zu den Zeitpunkten $t=3$ h und $t=5$ h gegenüber des Ausgangswertes nicht statistisch signifikant verändert.

In Gruppe „Gesunde nüchtern“ lag zum Zeitpunkt $t=0$ h die Konzentration des Gesamtcholesterins im Plasma bei $167,7 \pm 6,34$ mg/dl. Hierbei betrug die Konzentration des LDL-Cholesterins $95,2 \pm 6,47$ mg/dl und die des HDL-Cholesterins $59,7 \pm 5,07$ mg/dl. Auch hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der Parameter gegenüber des Ausgangswertes zu den Zeitpunkten $t=3$ h und $t=5$ h.

4.1.3 Differentialblutbild

Für alle Probanden der Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ wurde zu jedem Messzeitpunkt die Konzentration der Leukozyten im Vollblut bestimmt und ein Differentialblutbild angefertigt. Zum Zeitpunkt $t=0$ h ergab sich für Gruppe „Gesunde oTT“ eine Leukozytenkonzentration von $6,42 \pm 0,28 \times 10^9/l$, in der Gruppe „Gesunde nüchtern“ lag sie bei $6,55 \pm 0,37 \times 10^9/l$. In beiden Gruppen zeigte die Leukozytenkonzentration im Verlauf keine signifikante Veränderung (siehe Abb. 8).

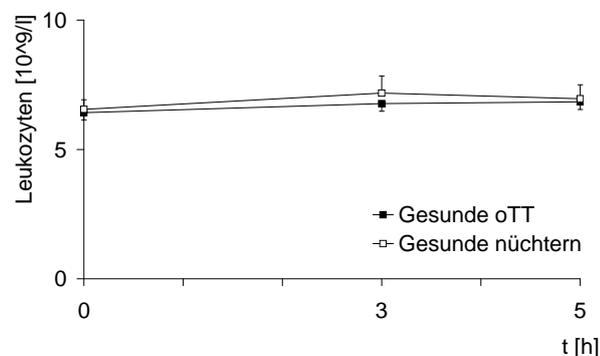


Abbildung 8: In den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ bleibt die Konzentration der Leukozyten unverändert.

Im Differentialblutbild zeigten sich in beiden Gruppen folgende Veränderungen: Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h in Gruppe „Gesunde oTT“ bei $3,01 \pm 0,18 \times 10^9/l$. Es kam zu einem Anstieg auf 142 ± 9 % der Ausgangskonzentration nach 3 h und auf 136 ± 8 % der Ausgangskonzentration nach 5 h ($p < 0,001$). Der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten lag zum

Zeitpunkt $t=0$ h bei $47,07 \pm 1,87\%$. Er stieg zum Zeitpunkt $t=3$ h auf $59,82 \pm 1,5\%$ und zum Zeitpunkt $t=5$ h auf $57,47 \pm 1,44\%$ ($p < 0,001$)(siehe Abb. 9).

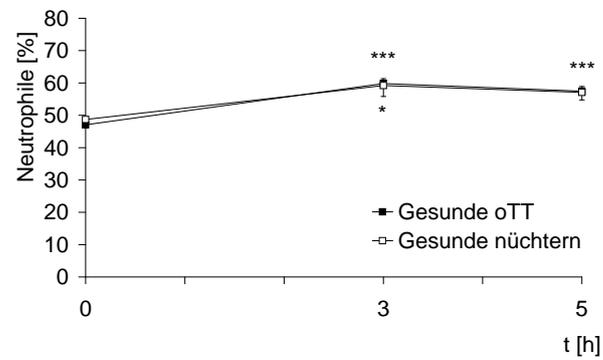
In Gruppe „Gesunde nüchtern“ lag die Konzentration der neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $3,23 \pm 0,26 \times 10^9/l$ und lag nach 3 h bei $128 \pm 13\%$, nach 5 h bei $123 \pm 10\%$ der Ausgangskonzentration ($p=0,12$). Der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $48,7 \pm 2,66\%$. Er stieg zum Zeitpunkt $t=3$ h auf $59,2 \pm 3,39\%$ und zum Zeitpunkt $t=5$ h auf $57,1 \pm 2,35\%$ ($p < 0,05$)(siehe Abb. 9).

Die Lymphozyten zeigten in Gruppe „Gesunde oTT“ eine Ausgangskonzentration von $2,61 \pm 0,19 \times 10^9$. Davon ausgehend fiel die Konzentration auf $82 \pm 5\%$ nach 3 h und erreichte zum Zeitpunkt $t=5$ h wieder $89 \pm 5\%$ der Ausgangskonzentration ($p < 0,005$). Der relative Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $40,37 \pm 2,05\%$. Er fiel zum Zeitpunkt $t=3$ h auf $30,13 \pm 1,26\%$ und zum Zeitpunkt $t=5$ h auf $32,52 \pm 1,31\%$ ($p < 0,001$)(siehe Abb. 10).

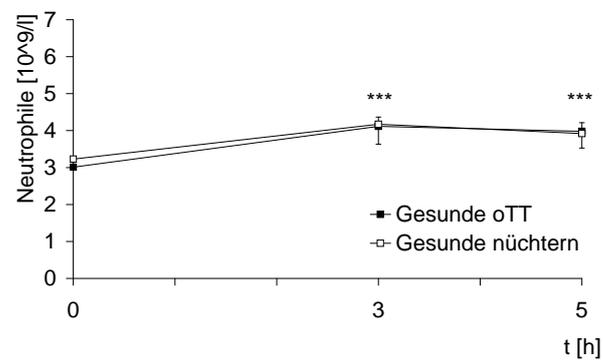
Zum Zeitpunkt $t=0$ h zeigten die Lymphozyten in Gruppe „Gesunde nüchtern“ eine Konzentration von $2,55 \pm 0,23 \times 10^9/l$. Zum Zeitpunkt $t=3$ h lag sie bei $87 \pm 7\%$, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $93 \pm 7\%$ der Ausgangskonzentration ($p=0,08$). Der relative Anteil der Lymphozyten an den Gesamtleukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $38,9 \pm 2,62\%$, zum Zeitpunkt $t=3$ h bei $31,2 \pm 2,59\%$, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $33,6 \pm 2,1\%$ ($p=0,094$)(siehe Abb. 10).

Die Monozyten zeigten in Gruppe „Gesunde oTT“ eine Ausgangskonzentration von $0,54 \pm 0,03 \times 10^9/l$. Zum Zeitpunkt $t=3$ h lag sie bei $91 \pm 3\%$, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $90 \pm 3\%$ der Ausgangskonzentration. Der relative Anteil der Monozyten an den Gesamtleukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $8,53 \pm 0,54\%$, nach 3 h bei $7,37 \pm 0,52\%$ und nach 5 h bei $7,23 \pm 0,52\%$ (siehe Abb. 11).

In Gruppe „Gesunde nüchtern“ lag die Ausgangskonzentration der Monozyten bei $0,56 \pm 0,04 \times 10^9/l$. Sie lag zum Zeitpunkt $t=3$ h bei $81 \pm 3\%$ und nach 5 h bei $84 \pm 5\%$. Der Anteil der Monozyten an allen Leukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $8,6 \pm 0,5\%$. Er fiel nach 3 h auf $6,5 \pm 0,45\%$ und nach 5 h auf $6,8 \pm 0,47\%$ ($p < 0,01$)(siehe Abb. 11).

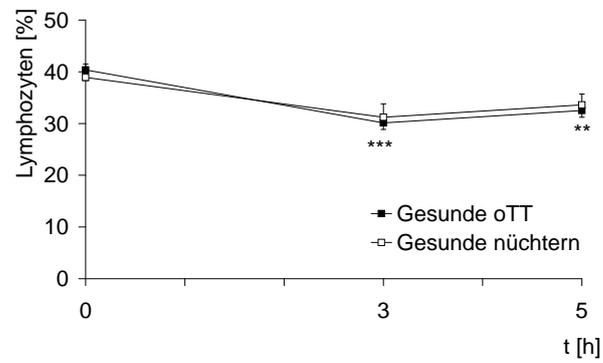


(a) Der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten an allen Leukozyten steigt in den Gruppen I und II an.

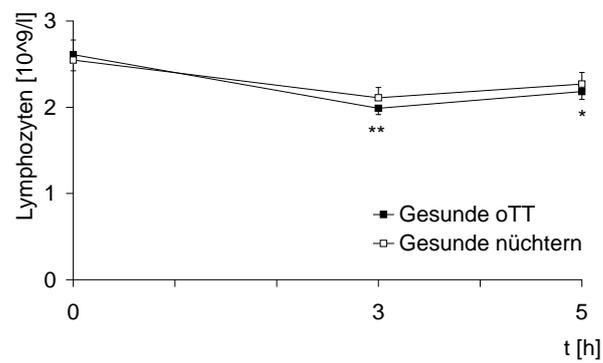


(b) Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten steigt in der Gruppe „Gesunde oTT“ an. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ zeigt sie keine signifikante Veränderung.

Abbildung 9: Die neutrophilen Granulozyten in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“

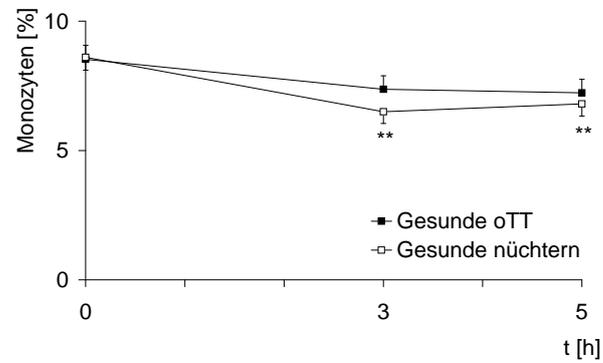


- (a) In der Gruppe „Gesunde oTT“ fällt der relative Anteil der Lymphozyten an alle Leukozyten. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ zeigt er keine signifikante Veränderung.

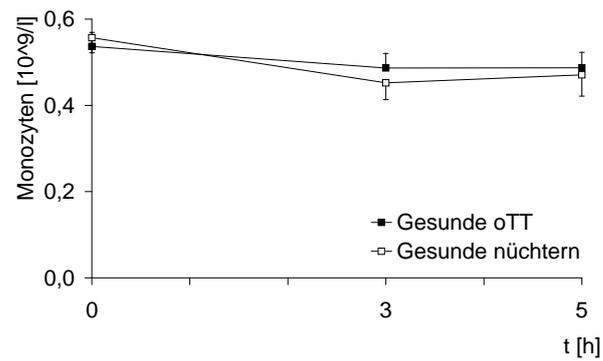


- (b) In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ fällt die Konzentration der Lymphozyten. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ zeigt sie keine signifikante Veränderung.

Abbildung 10: Die Lymphozyten in den Gruppe „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“



- (a) Der relative Anteil der Monozyten an allen Leukozyten bleibt in der Gruppe „Gesunde oTT“ unverändert. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ fällt er ab.



- (b) Die Konzentration der Monozyten bleibt in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ unverändert.

Abbildung 11: Die Monozyten in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“

4.1.4 Monozyten

Subpopulationen

In der Gruppe „Gesunde oTT“ lag der Anteil der CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten an allen Monozyten zum Zeitpunkt t=0 h bei $4,19 \pm 0,31$ %, der Anteil der CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten bei $2,46 \pm 0,29$ %, was einem Anteil von $6,65 \pm 0,51$ % CD16^{pos}-Monozyten an allen CD14-exprimierenden Monozyten entspricht. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ stellten zum Zeitpunkt t=0 h die CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten $4,87 \pm 0,64$ %, die CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten $2,74 \pm 0,53$ % der Monozyten. Der Anteil der CD16^{pos}-Monozyten an allen CD14-exprimierenden Monozyten lag also bei $7,61 \pm 0,99$ %.

Unabhängig von der Aufnahme von Sahne beziehungsweise Wasser zeigte sich in beiden Gruppen zu den Zeitpunkten t=3 h und t=5 h keine statistisch signifikante Veränderung der Zusammensetzung der Monozyten bezüglich dieser Subpopulationen im Vergleich zu den Ausgangswerten.

CD14 und CD11b

Die MFI von CD11b auf Monozyten war sowohl in der Gruppe „Gesunde oTT“ als auch in der Gruppe „Gesunde nüchtern“ zu den Messzeitpunkten t=3 h und t=5 h gegenüber des Ausgangswertes nicht signifikant verändert.

CD14 zeigte in der Gruppe „Gesunde oTT“ eine gleichbleibende MFI zu allen Messzeitpunkten. Zum Zeitpunkt t=0 h lag sie bei 534 ± 33 . In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ sank die MFI von

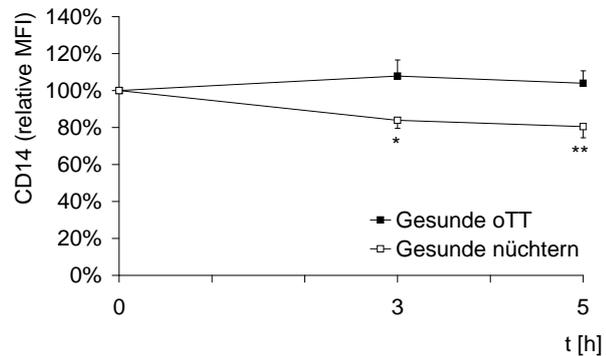


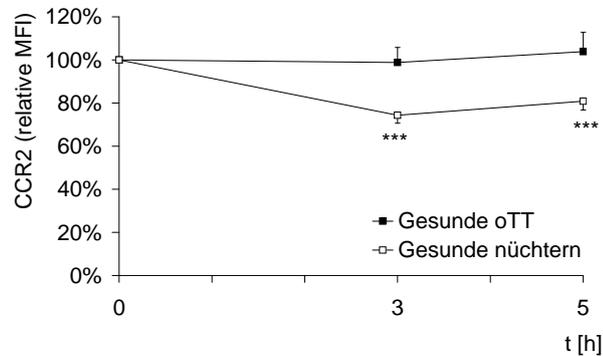
Abbildung 12: Die mittlere Fluoreszenzintensität von CD14 bleibt in der Gruppe „Gesunde oTT“ nach oTT unverändert. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ fällt sie im Verhältnis zum Ausgangswert signifikant ab ($p < 0,01$).

CD14 auf Monozyten bezüglich ihres Ausgangswert von 486 ± 57 auf $84 \pm 4\%$ nach 3 h und auf $81 \pm 6\%$ nach 5 h (siehe Abb. 12) ($p < 0,01$)

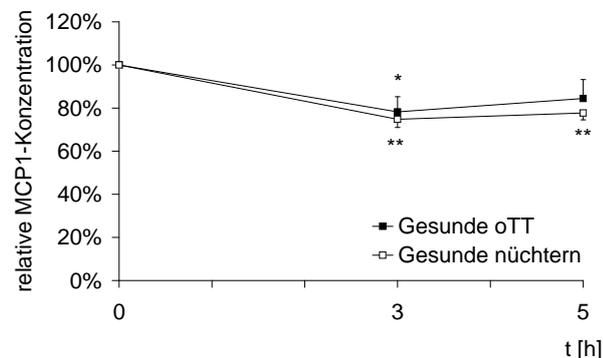
Chemokine und ihre Rezeptoren

In der Durchflusszytometrie wurde die Stärke der Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 auf Monozyten gemessen. Die Plasmakonzentration ihrer Liganden, MCP1 und Fractalkine, wurde mittels ELISA bestimmt.

In der Gruppe „Gesunde oTT“ zeigte CCR2 zu allen drei Messzeitpunkten eine nicht signifikant veränderte MFI. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ war ein Rückgang der MFI von CCR2 auf $74 \pm 4\%$ des Ausgangswertes zum Zeitpunkt $t=3$ h und ein anschließender Wiederanstieg auf $81 \pm 4\%$ des Ausgangswertes zu verzeichnen. In der Gruppe „Gesunde oTT“ lag die Konzentration des CCR2-Liganden MCP1 zum Zeitpunkt $t=3$ h bei $79 \pm 6\%$ des Ausgangswertes, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei $82 \pm 8\%$ des Ausgangswertes ($n=12$, $p < 0,05$). In der Gruppe „Gesunde nüchtern“



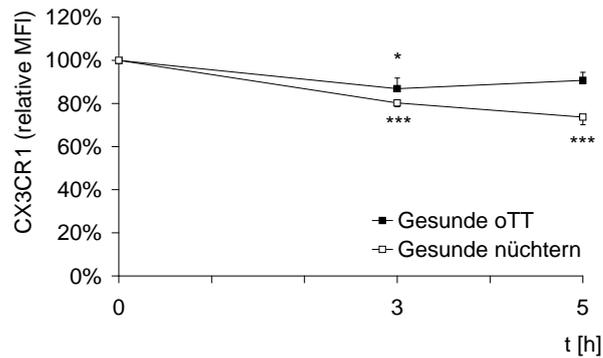
- (a) In der Gruppe „Gesunde oTT“ bleibt die mittlere Fluoreszenzintensität von CCR2 auf Monozyten unverändert. In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ fällt sie signifikant ab.



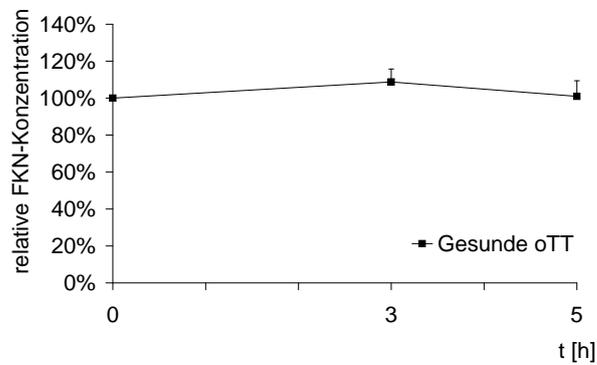
- (b) Die MCP1-Konzentration im Serum fällt in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“.

Abbildung 13: Die Expression von CCR2 auf Monozyten und die Serumkonzentration von MCP1 in den Gruppe „Gesunde oTT“ und II

fiel die Konzentration von MCP1 im Serum auf $75 \pm 4\%$ gegenüber der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt $t=3\text{ h}$ und auf $78 \pm 3\%$ zum Zeitpunkt $t=5\text{ h}$ ($p < 0,01$) (siehe Abb. 13).



- (a) Die mittlere Fluoreszenzintensität von CX3CR1 auf Monozyten fällt in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ signifikant ab.



- (b) Die Fractalkine-Konzentration im Serum zeigt in der Gruppe „Gesunde oTT“ keine Veränderung.

Abbildung 14: Die Expression von CX3CR1 auf Monozyten in den Gruppen „Gesunde oTT“ und „Gesunde nüchtern“ und die Serumkonzentration von Fractalkine in der Gruppe „Gesunde oTT“

Die MFI von CX3CR1 auf Monozyten lag in der Gruppe „Gesunde oTT“ zum Zeitpunkt $t=3$ h bei 87 ± 5 %, zum Zeitpunkt $t=5$ h bei 91 ± 4 % des Ausgangswertes ($n=10$, $p<0,01$). In der Gruppe „Gesunde nüchtern“ zeigte sich zum Zeitpunkt $t=3$ h eine MFI von 80 ± 2 %, zum Zeitpunkt $t=5$ h eine MFI von 74 ± 4 % des Ausgangswertes ($p<0,001$). Die Konzentration des CX3CR1-Liganden Fractalkine im Serum wurde lediglich in der Gruppe „Gesunde oTT“ bestimmt. Die Messwerte zu allen drei Messzeitpunkten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Abb. 14).

sICAM im Serum

Bei 13 Probanden der Gruppe „Gesunde oTT“ wurde die Serumkonzentration von sICAM bestimmt. Diese lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $7,47 \pm 0,51$ ng/ml und zeigte sich zu den Zeitpunkten $t=3$ h und $t=5$ h nicht signifikant verändert.

TNF α im Serum

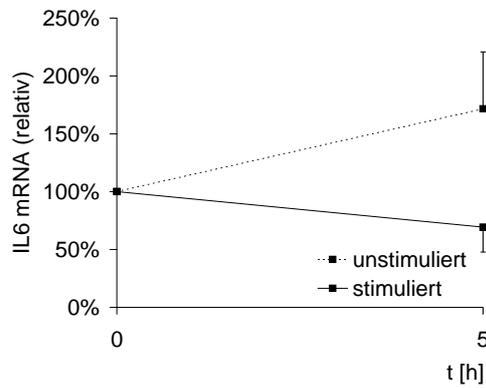
Bei 13 Probanden der Gruppe „Gesunde oTT“ und allen Probanden der Gruppe „Gesunde nüchtern“ wurde die Konzentration von TNF α im Serum mittels ELISA zu allen Messzeitpunkten bestimmt. In keiner der beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Veränderung der TNF α -Konzentration im Serum nach oTT.

Genexpression von Monozyten

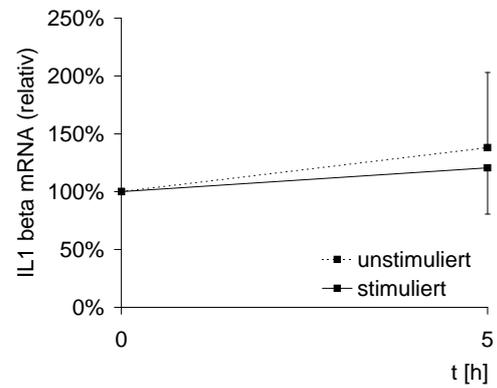
Aus dem Blut von zehn Teilnehmern der Gruppe „Gesunde oTT“ wurden zu den Zeitpunkten $t=0$ h und $t=5$ h Monozyten isoliert. Sowohl aus den nativen Monozyten als auch aus Monozyten, die über 3 h bei 37°C mit LPS (10 ng/ml) stimuliert wurden ($n=10$), um gegebenenfalls inflammatorische Prozesse in extrapolierte Form darzustellen, wurde mRNA extrahiert. Diese diente nach reverser Transkription als Grundlage der Untersuchung der Genexpression mittels *real-time*-PCR. Dabei wurde Genexpression der folgenden Cytokine untersucht:

- IL1 β
- IL6

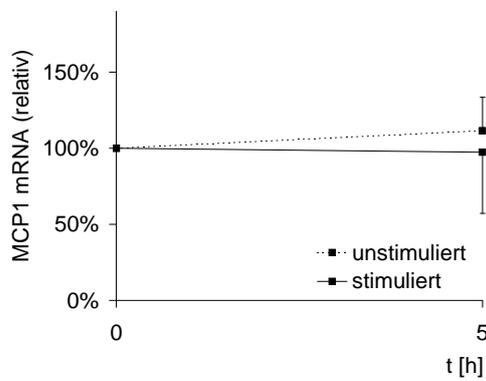
- MCP1
- TNF α



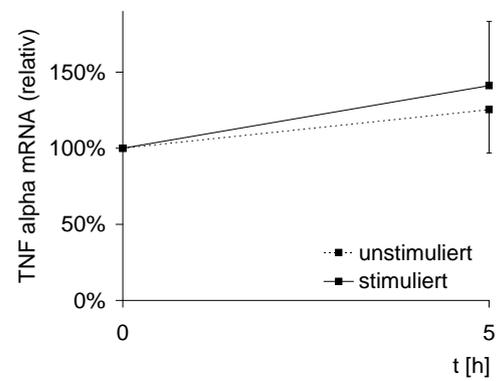
(a) Die Expression von IL6 bleibt nach oTT unverändert.



(b) Die Expression von IL1 β bleibt nach oTT unverändert.



(c) Die Expression von MCP1 bleibt nach oTT unverändert.



(d) Die Expression von TNF α bleibt nach oTT unverändert.

Abbildung 15: Die Expression der Gene für IL6, IL1 β , MCP1 und TNF α zeigt in nativen und stimulierten Monozyten nach oTT keine signifikante Veränderung.

Die cDNA des *housekeeping*-Gens 18S diene als interner Standard. Die Stärke der Expression des jeweils untersuchten Gens wurde im Verhältnis zur gleichzeitigen Expression der 18S-mRNA betrachtet.

Die Konzentration der 18S-mRNA bei stimulierten Monozyten war vergleichbar mit der Konzentration bei unstimulierten Monozyten. Die Expression der untersuchten inflammatorische Proteine hingegen war bei den stimulierten Monozyten um ein bis vier Zehnerpotenzen höher als bei den unstimulierten Monozyten.

Weder im nativen noch im stimulierten Zustand zeigte eines der untersuchten Gene zum Zeitpunkt $t=5$ h eine signifikante Veränderung der Stärke der Expression im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ h (siehe Abb. 15).

4.2 Patienten mit koronarer Herzkrankheit

4.2.1 Grundcharakteristik

Charakteristikum	Mittelwert \pm Standardfehler
Alter	65,62 \pm 1,72 Jahre
Geschlecht	83 %männlich; 17 %weiblich
Größe	1,69 \pm 0,02 m
Gewicht	85,93 \pm 3,34 kg
BMI	31,86 \pm 3,79 kg/m ²
BSA	13,02 \pm 1,69 m ²
Gesamtcholesterin	180,63 \pm 6,67 mg/dl
HDL	47,83 \pm 2,56 mg/dl
LDL	109,73 \pm 6,04 mg/dl
Nüchernglucose	1,99 \pm 0,03 mg/dl
Medikation	Anteil der KHK-Patienten[%]
ASS	100
β -Blocker	93

Fortsetzung auf der nächsten Seite

ACE-Hemmer/ Angiotensinantagonisten	100
Diuretika	45
Thiazid	30
Statin	90

Tabelle 10: Gruppe „KHK oTT“: Teilnehmer mit KHK

4.2.2 Lipidprofil

Bei den im Rahmen der HCS-Studie untersuchten Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Gruppe „KHK oTT“) wurde zu den Messzeitpunkten $t=0$ h, $t=3$ h und $t=5$ h die Konzentration der Triglyceride im Plasma bestimmt. Die Konzentrationen des Gesamtcholesterins, des HDL-Cholesterins und des LDL-Cholesterins im Plasma wurden nur zum Zeitpunkt $t=0$ h bestimmt.

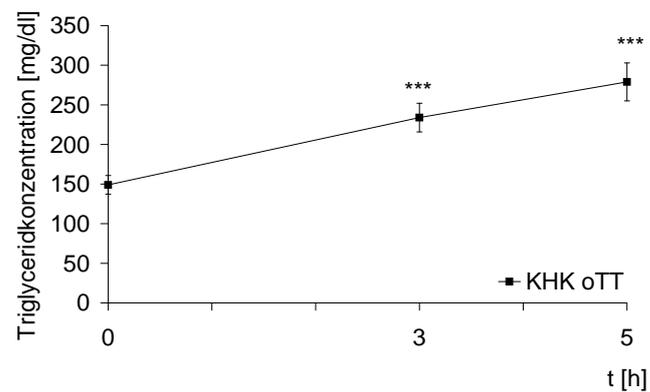


Abbildung 16: Die Triglyceridkonzentration steigt in der Gruppe „KHK oTT“ signifikant an.

In der Gruppe „KHK oTT“ lag zum Zeitpunkt $t=0$ h die Triglyceridkonzentration im Plasma bei $149,03 \pm 11,68$ mg/dl. 3 h nach der oralen Aufnahme von 250 ml Sahne lag die Triglyceridkonzentration bei $233,93 \pm 18,03$ mg/dl, nach 5 h bei $278,9 \pm 23,95$ mg/dl. Dies

entspricht einem Anstieg auf $161 \pm 8 \%$ des Ausgangswertes nach 3 h und auf $188 \pm 9 \%$ des Ausgangswertes nach 5 h. Die Triglyceridkonzentration im Plasma zeigte also zum Zeitpunkt $t=5$ h eine steigende Tendenz (siehe Abb. 16).

Zum Zeitpunkt $t=0$ h lag die Konzentration des Gesamtcholesterins der Probanden der Gruppe „KHK oTT“ bei $180,63 \pm 6,67$ mg/dl, die Konzentration des HDL-Cholesterins bei $47,83 \pm 2,56$ mg/dl, die Konzentration des LDL-Cholesterins bei $109,73 \pm 6,04$ mg/dl.

4.2.3 Differentialblutbild

Bei zehn Teilnehmern der Gruppe „KHK oTT“ wurde zu den Zeitpunkten $t=0$ h und $t=3$ h die Konzentration der Leukozyten im Vollblut gemessen und ein Differentialblutbild erstellt.

Die Konzentration der Leukozyten lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $8,83 \pm 0,56 \times 10^9/l$ und war demgegenüber zum Zeitpunkt $t=3$ h nicht signifikant verändert (siehe Abb. 17).

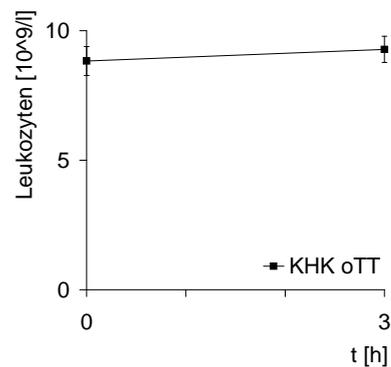
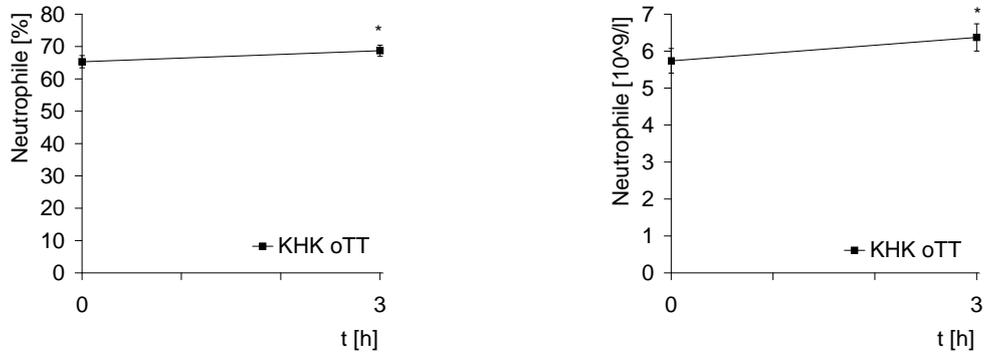


Abbildung 17: In der Gruppe „KHK oTT“ bleibt die Konzentration der Leukozyten im Zeitverlauf konstant.

Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten stieg bezüglich ihres Ausgangswertes von $5,74 \pm 0,33 \times 10^9/l$ auf $112 \pm 3 \%$ ($n=10$, $p<0,05$). Der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten stieg von einem Ausgangswert von $65,3 \pm 1,9 \%$

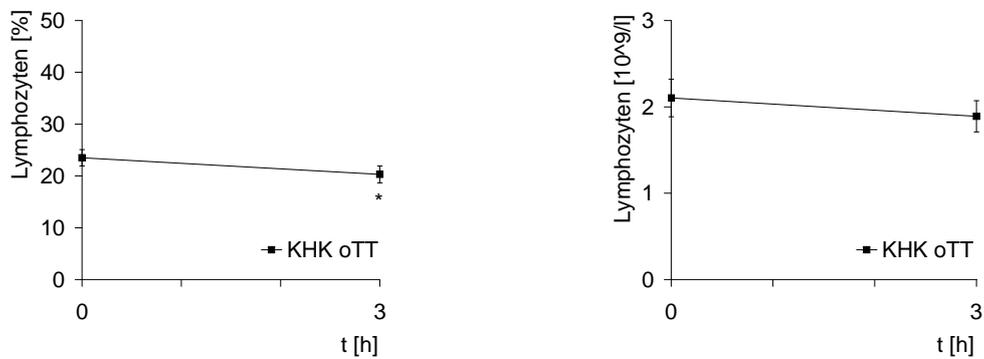
auf $68,7 \pm 1,72\%$ zum Zeitpunkt $t=3\text{ h}$ ($p < 0,05$) (siehe Abb. 18).



(a) Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten an allen Leukozyten steigt in der Gruppe „KHK oTT“ an.

(b) Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten steigt in der Gruppe „KHK oTT“ an.

Abbildung 18: Die neutrophilen Granulozyten in der Gruppe „KHK oTT“



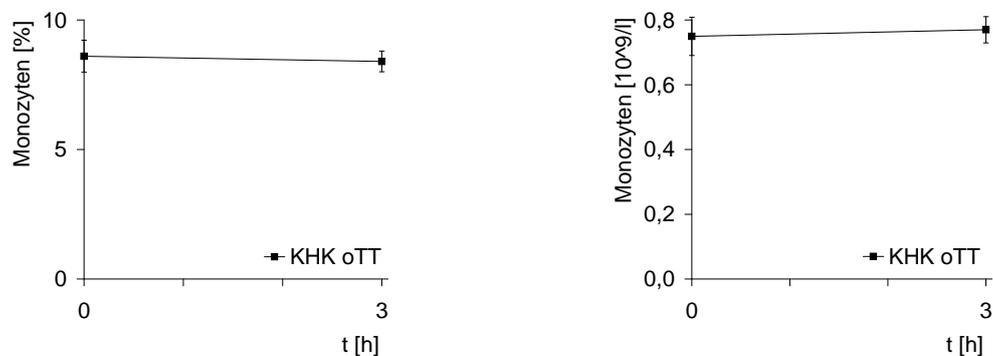
(a) Der prozentuale Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten fällt in der Gruppe „KHK oTT“ ab.

(b) Die Konzentration der Lymphozyten zeigt in der Gruppe „KHK oTT“ keine signifikante Veränderung.

Abbildung 19: Die Lymphozyten in der Gruppe „KHK oTT“.

Zum Zeitpunkt $t=0$ h lag die Lymphozytenkonzentration bei $2,1 \pm 0,22 \times 10^9/l$ und zeigte im Zeitverlauf keine signifikante Veränderung. Der relative Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten fiel von einem Ausgangswert von $23,50 \pm 1,58 \%$ auf $20,3 \pm 1,63 \%$ zum Zeitpunkt $t=3$ h ($n=10$, $p<0,05$) (siehe Abb. 19).

In der Gruppe „KHK oTT“ lag die Konzentration der Monozyten zum Zeitpunkt $t=0$ h bei $0,75 \pm 0,06 \times 10^9/l$, ihr relativer Anteil an den Gesamtleukozyten bei $8,6 \pm 0,62 \%$. Beide Parameter zeigten zum Zeitpunkt $t=3$ h keine signifikante Veränderung (siehe Abb. 20).



(a) Der prozentuale Anteil der Monozyten an allen Leukozyten bleibt in der Gruppe „KHK oTT“ unverändert.

(b) Die Konzentration der Monozyten zeigt in der Gruppe „KHK oTT“ keine Veränderung.

Abbildung 20: Die Monozyten in der Gruppe „KHK oTT“

4.2.4 Monozyten

Subpopulationen

Bei 27 der Probanden der Gruppe „KHK oTT“ wurde durchflusszytometrisch der Anteil der $CD14^{low}CD16^{pos}$ -Monozyten, der $CD14^{high}CD16^{pos}$ -Monozyten und der Anteil

der CD16pos-Monozyten an der Gesamtheit der CD14-exprimierenden Monozyten bestimmt. Zum Zeitpunkt $t=0$ h stellten die CD14lowCD16pos-Monozyten $3,4 \pm 0,33$ % und die CD14highCD16pos-Monozyten $3,21 \pm 0,42$ % der Monozyten. Das entspricht einem Anteil von $6,61 \pm 0,71$ % CD16pos-Monozyten an allen CD14-exprimierenden Monozyten. Zum Zeitpunkt $t=3$ h waren die Anteile der Subpopulationen nicht signifikant verändert.

CD14 und CD11b

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b und CD14 auf Monozyten wurde in der Gruppe „KHK oTT“ zu den Zeitpunkten $t=0$ h und $t=3$ h durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei zeigte sich zu beiden Messzeitpunkten eine nicht signifikant veränderte MFI von CD11b. Die MFI von CD14 lag zum Zeitpunkt $t=0$ h bei 689 ± 35 und zum Zeitpunkt $t=3$ h bei 90 ± 5 % des Ausgangswertes ($p < 0,05$) (siehe Abb. 21).

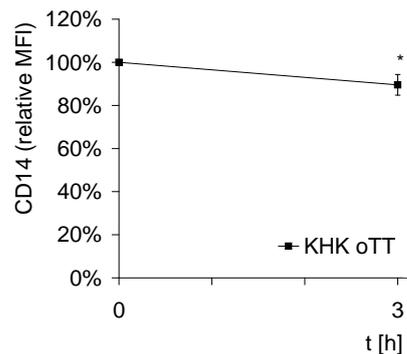


Abbildung 21: Die mittlere Fluoreszenzintensität von CD14 fällt in der Gruppe „KHK oTT“ im Zeitverlauf.

CCR2 und MCP1

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 wurde durchflusszytometrisch zu den Zeitpunkten $t=0$ h und $t=3$ h ermittelt. Die MFI zeigte zu beiden Messzeitpunkten keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 22).

Die Konzentration des CCR2-Liganden MCP1 im Serum wurde mittels ELISA zu den

Zeitpunkten $t=0$ h und $t=5$ h bestimmt. Zum Zeitpunkt $t=5$ h lag die Konzentration bei 81 ± 5 % des Ausgangswertes ($p < 0,001$).

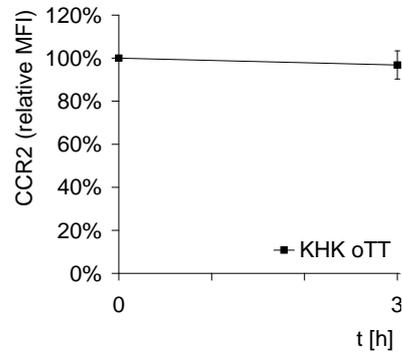


Abbildung 22: Die mittlere Fluoreszenzintensität von CCR2 bleibt in der Gruppe „KHK oTT“ unverändert.

4.3 Korrelationsanalysen

Um zu prüfen, ob eine lineare quantitative Beziehung zwischen den Triglyceriden im Plasma und den gemessenen monozytären und humoralen Markern besteht, wurden Korrelationsanalysen nach *Pearson* eingesetzt. Für das Merkmal „Triglyceride“ auf der einen Seite und das Merkmal „Marker“ (gilt für jeden gemessenen Parameter) auf der anderen Seite wurden Korrelationsanalysen für folgende Messergebnisse angestellt:

- Die absoluten Messergebnisse zu allen Messzeitpunkten
- Die absoluten Unterschiede zwischen den Messergebnissen zu den Zeitpunkten $t=3$ h sowie $t=5$ h und dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ h
- Das Verhältnis der Messergebnisse zu den Zeitpunkten $t=3$ h und $t=5$ h zu dem Messergebnis zum Zeitpunkt $t=0$ h

Dabei zeigte sich bei keinem der gemessenen Parameter eine signifikante Korrelation mit den Plasmatriglyceriden.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden keine triglyceridabhängigen Veränderungen der Expression der monozytären Oberflächenmoleküle CD11b und CD14 beobachtet. Auch die Zusammensetzung der Monozyten bezüglich ihrer Subpopulationen blieb unverändert. Ebenso konnte kein Einfluss der oralen Triglyceridbelastung auf Cytokine im Serum beobachtet werden.

Das Differentialblutbild unterlag unabhängig von der oralen Triglyceridbelastung innerhalb des Beobachtungszeitraumes folgenden Veränderungen: Es kam zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, während es sich ein Abfall der Lymphozyten und der Monozyten zeigte.

Die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 zeigten bei den nüchternen Probanden einen Abfall, der nach Triglyceridbelastung aufgehoben wurde.

5.1 Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Methodik

Aus der Literatur sind bereits einige Studien bekannt, die sich mit dem Zusammenhang zwischen postprandialer Triglyceridämie nach oraler Lipidbelastung und proatherogenen Parametern beschäftigen. Die methodische Herangehensweise an die Frage, ob postprandiale Triglyceridämie proatherogen wirkt, ist jedoch nicht einheitlich.

5.1.1 Der Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum nach oraler Triglyceridbelastung umfasst in anderen Studien 4 h^{19;20;65;86} bis 10 h². In der vorliegenden Studie wurden die gesunden Probanden 5 h lang nachbeobachtet. Die teilnehmenden KHK-Patienten unterzogen sich im Rahmen der *HCS-Studie* zum Zeitpunkt $t=3$ h einem oralen Glucosetoleranztest. Da dieser die Reaktion proinflammatorischer Parameter wie zum Beispiel die CD11b-Expression beeinflussen könnte^{86;97;112}, wurde der Beobachtungszeitraum bei diesen Patienten bezüglich proinflammatorischer Parameter auf 3 h beschränkt.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie sind möglicherweise durch den Beobachtungszeitraum limitiert. Die in der Literatur beschriebenen potentiell proinflammatorischen Effekte postprandialer Triglyceridämie treten teilweise später als fünf Stunden nach oraler Triglyceridbelastung oder dauern länger als fünf Stunden an [2;12;13;28;69;97;91;92](#)

5.1.2 Die Analysemethoden

Es gibt verschiedene Herangehensweisen, um proatherogene inflammatorische Prozesse nachzuweisen und zu quantifizieren. Die meisten Studien, die sich mit postprandialen proatherogenen Vorgängen beschäftigen, untersuchen die Konzentration von Adhäsionsmolekülen, Selektinen, Cytokinen, Chemokinen, Interleukinen und anderen proinflammatorischen Molekülen im Plasma oder Serum [12;13;19;28;65;67;69;86;97;99;104;111;94](#). Drei Studien betrachten die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b [2;91;92](#), CD11a, CD66b und CD62L [91;92](#) auf Monozyten mittels Durchflusszytometrie. Des Weiteren werden die Leukozytenkonzentration und das Differentialblutbild als Indikator inflammatorischer Prozesse herangezogen [2;67;91;92;93;94](#)

Die vorliegende Arbeit nähert sich der Atherogenese von verschiedenen Seiten, wobei das Hauptaugenmerk auf die Monozyten gerichtet wurde. Bei den betrachteten Parametern handelte es sich um:

- Differentialblutbild
- Expression von Oberflächenmolekülen auf zirkulierenden Monozyten (FACS)
- Monozytäre Subpopulationen (FACS)
- Genexpression nativer und stimulierter zirkulierender Monozyten (*real-time*-PCR)
- Konzentration von sICAM und TNF α im Serum (ELISA)

Bei der Arbeit mit Monozyten wurde auf eine Minimierung der *ex vivo*-Aktivierung geachtet: Die Proben wurden nach Blutentnahme innerhalb von 20 min den Versuchen zugeführt, da Voruntersuchungen ergaben, dass es mit einer Wartezeit zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommt. In der Zeit der Anfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse

wurden die Zellen auf Eis gelagert. Zentrifugationen fanden bei 4 °C statt. Lediglich in der Zeit der Erythrozytenlyse befanden sich die Proben bei Raumtemperatur. Bei der Isolation von Monozyten zur RNA-Extraktion wurde ebenfalls darauf geachtet, dass die Proben gekühlt wurden.

5.1.3 Das Probandenkollektiv

Die Studien, die sich mit postprandialer Triglyceridämie beschäftigen, untersuchen gesunde Probanden^{2;12;13;111;92;93;94}, Probanden, bei denen kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie⁶⁵, Adipositas^{67;99}, Diabetes mellitus 2^{19;86} oder das metabolische Syndrom^{28;104} vorliegen, sowie Probanden, die an einer KHK leiden^{69;91}. Das Vorliegen von Risikofaktoren geht sowohl mit einer veränderten postprandialen Triglyceridkinetik als auch mit einer veränderten postprandialen Reaktion von proatherogenen Molekülen im Serum einher^{19;65;67;86;97}.

Es ist also zu beachten, dass allein die Auswahl des Probandenkollektivs eine Ursache für eine Variabilität der Ergebnisse sein kann.

5.1.4 Die Testmahlzeiten zur Induktion einer postprandialen Triglyceridämie

Zusammensetzung

Bislang gibt es keinen Goldstandard eines Testes zur Untersuchung der Effekte der postprandialen Triglyceridämie. In der Literatur sind verschiedene Ansätze zu finden: Es werden Testmahlzeiten eingesetzt, die neben Triglyceriden auch Proteine und Kohlenhydrate enthalten, wie zum Beispiel eine *Fast-food*-Mahlzeit oder Pizza^{12;13;28;65;67;69;86;97;99;111}. Diese Testmahlzeiten beeinflussen folglich nicht ausschließlich den Triglyceridmetabolismus. Dies erschwert die Interpretation der Ergebnisse, da unklar bleibt, welche Nahrungsbestandteile für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Insbesondere wurde mehrfach gezeigt, dass durch die Aufnahme von Glucose inflammatorische Parameter wie die Expression von CD11b auf zirkulierenden Monozyten¹¹² oder die TNF α -Serumkonzentration^{86;97} beeinflusst werden. In einigen Studien wird Schlagsahne mit

einem Glucoseanteil von 3 %^{2;91;92} verwendet. Dies entspricht einem Anteil von 3,75 g Glucose/m² BSA⁹¹. Weitere Studien setzen zur Induktion einer Triglyceridämie Schlagsahne mit einem Anteil von 5 g Kohlenhydrate/m² BSA ein^{19;20}.

In der vorliegenden Studie wurde glucosefreie Schlagsahne zur Induktion einer postprandialen Triglyceridämie eingesetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3 auf Seite 29). Dieses Testgetränk erwies sich als geeignet, einen signifikanten Anstieg der Serumtriglyceride herbeizuführen, ohne die Serumkonzentrationen von Cholesterin und Glucose postprandial zu beeinflussen. Sahne bietet darüber hinaus den Vorteil einer optimalen Dosierbarkeit. Lediglich das Fettsäurespektrum der Schlagsahne ist schlecht kontrollierbar, da es jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuren sind ein potentieller Störfaktor, da postprandiale proinflammatorische Reaktionen von der Art der aufgenommenen Fettsäuren abhängen¹².

Applizierte Triglyceridmenge

Bezüglich der applizierten Triglyceridmenge finden sich zwei verschiedene Arten von Testprotokollen: solche, die applizierte Triglyceridmenge an die Körperoberfläche oder an das Körpergewicht adaptieren^{2;12;13;19;20;67;69;97;91;92;93;94} und solche, die eine feste Triglyceridmenge applizieren^{28;65;99;111}. Auch in der vorliegenden Studie war die applizierte Triglyceridmenge für alle Teilnehmer gleich, unabhängig von Körpergewicht und -oberfläche. Dabei zeigten weder das Ausmaß des Anstiegs der Triglyceridkonzentration im Serum noch die postprandialen Reaktionen der gemessenen proinflammatorischen Parameter eine Korrelation mit der applizierten Menge pro m² BSA beziehungsweise pro kg Körpergewicht. Daher scheint es eine probate und praktische Lösung zu sein, einen Triglyceridtoleranztest mit einheitlicher Triglyceridmenge einzusetzen.

Auch bezüglich der applizierten Fettmenge finden sich Variationen zwischen den verschiedenen Testprotokollen. Die Studien, die mit einem Triglyceridtoleranztest einheitlicher Fettmenge arbeiten, applizieren zwischen 50 g Fett⁶⁵ und 58 g Fett¹¹¹. Die Protokolle, die die applizierte Fettmenge an die Körperoberfläche adaptieren, variieren im Bereich von 48,5 g Fett pro m² BSA⁶⁷ bis 75 g Fett pro m² BSA^{19;20}, wobei der Großteil der Studien 50 g Fett pro m² BSA einsetzt^{2;104;91;92;93;94}. In der vorliegenden Studie wurde ein

Triglyceridtoleranztest mit 80 g Fett eingesetzt. Dies entsprach in der Gruppe „Gesunde oTT“ $44,28 \pm 1,17$ g/m²BSA, in der Gruppe „KHK oTT“ $40,44 \pm 0,69$ g/m²BSA.

Es ist nicht geklärt, ob große Triglyceridmengen *per se* proinflammatorische Prozesse induzieren oder ob sie Effekte extrapolieren, die auch bei der Aufnahme kleinerer Triglyceridmengen auftreten.

5.2 Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Ergebnisse

5.2.1 Die induzierte Triglyceridämie

Nicht alle Publikationen geben eine detaillierte Auskunft über die postprandiale Triglyceridkinetik, so dass hier kein Vergleich der Studien bezüglich des absoluten und relativen Anstiegs der Serumtriglyceride möglich ist. Auffällig ist jedoch, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des postprandialen Anstiegs der Triglyceride und vielen unterschiedlichen Faktoren gibt. Zum Einen zeigen unterschiedliche Probandenkollektive unterschiedliche Reaktionen auf orale Triglyceridbelastung. Verglichen mit gesunden Kontrollprobanden zeigt sich ein stärkerer oder prolongierter Anstieg der Serumtriglyceride bei Patienten mit folgenden kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen:

- Diabetes mellitus 2 ^{19;20;86}
- arterielle Hypertonie ⁶⁵
- Hyperlipidämie ⁸⁹
- Adipositas ⁶⁷
- KHK ⁹⁶

Darüber hinaus wird durch verschiedener Interventionen wie Sport ⁶⁷, diätetische Maßnahmen ⁹⁹ sowie die Behandlung mit Fischöl ⁹⁹, Fibraten ¹⁰⁴ oder Statinen ⁹¹ der individuelle Anstieg der Serumtriglyceride infolge oraler Fettaufnahme alteriert.

Auch in der vorliegenden Arbeit unterscheidet sich die postprandiale Triglyceridkinetik zwischen den KHK-Patienten und den gesunden Probanden. Da diese beiden Gruppen

jedoch nicht bezüglich ihrer Grundcharakteristika gematcht waren, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Faktoren ausschlaggebend für den beobachteten Unterschied sind.

Noch ist unklar, welche Bedeutung die Unterschiede in der postprandialen Triglyceridkinetik zwischen verschiedenen Probandenkollektiven haben. Führt das Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus 2 oder Adipositas zu einer alterierten postprandialen Triglyceridkinetik? Oder aber fördert eine veränderte Triglyceridtoleranz die Entwicklung der genannten kardiovaskulären Risikofaktoren? Oder gibt es eine gemeinsame Ursache für beides?

5.2.2 Auswirkungen auf das Differentialblutbild

Andere Studien, die sich mit der Bedeutung postprandialer Triglyceride für das Differentialblutbild beschäftigt haben, sind entweder nicht negativkontrolliert^{2;91} oder nicht komplett konsistent in ihrer Aussage über den Effekt postprandialer Triglyceride auf das Differentialblutbild^{92;93;94}. Drei negativkontrollierten Studien sagen aus, dass die Aufnahme von Triglyceriden zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozyten führt, die sich bei den Negativkontrollen, die nur Wasser zu sich nehmen, nicht zeigt. Ob das Differentialblutbild in signifikanter Weise von postprandialen Triglyceriden im Vergleich zu Wasser beeinflusst wird, wird unterschiedlich befunden: Eine Studie findet keine Unterschiede, sowohl was neutrophile Granulozyten als auch Lymphozyten als auch Monozyten betrifft⁹². Zwei Studien beschreiben einen signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit oraler Triglyceridaufnahme^{93;94}.

In der vorliegenden Studie zeigten sich Veränderungen im Differentialblutbild, die in einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten zugunsten eines Abfalls der Lymphozyten und eines Abfalls der Monozyten bestand, wobei die Leukozytenkonzentration an sich unverändert blieb (siehe Abb. 8 bis 11 und Abb. 17 bis 20). Bei Probanden, die einen oTT durchführten, traten diesselben Veränderungen auf wie in der Gruppe „Gesunde nüchtern“.

Alles in allem deuten die bisherigen Untersuchungen darauf hin, dass das Differentialblutbild zirkadianen Schwankungen unterliegt, die durch Triglyceridaufnahme am Mor-

gen nicht moduliert werden.

5.2.3 Auswirkungen auf zirkulierende Monozyten

Schon vorangehende Studien beschäftigten sich mit dem Zusammenhang zwischen postprandialen Triglyceriden und dem Aktivierungsgrad zirkulierender Monozyten. Hierbei wurde mehrfach ein triglyceridabhängiger Anstieg der MFI von CD11b auf peripheren Monozyten beschrieben^{2;91;92}. Eine dieser Studien beschreibt überdies eine Korrelation zwischen der Differenz der Triglyceridkonzentration und der Differenz der MFI von CD11b auf Monozyten vor und nach oraler Fettaufnahme⁹². Im Gegensatz dazu blieb in der vorliegenden Studie durchflusszytometrisch bestimmte Expression auf zirkulierenden Monozyten gleich, unabhängig davon, ob eine Triglyceridaufnahme stattfand oder nicht. Dieser Widerspruch lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der Beobachtungszeitraum in der vorliegenden Arbeit mit 5 Stunden kürzer war als in diesen Studien, die einen signifikanten Anstieg der CD11b-Expression auf Monozyten zum Teil erst nach 6 Stunden⁹² oder nach 8 Stunden⁹¹ beschreiben. Des Weiteren ist zu vermerken, dass der Kohlenhydratanteil von 3 % der Sahne, die in diesen Studien als Testgetränk verwendet wurde, als Störvariable nicht völlig auszuschließen ist. Andere mögliche Ansatzpunkte zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse sind weitere Unterschiede in der Zusammensetzung des Testgetränkes (Fettsäuren, Cholesterin und andere Bestandteile), Unterschiede in der aufgenommenen Triglyceridmenge, die in der vorliegenden Arbeit fix war, und in den genannten Studien BSA-adaptiert sowie Unterschiede im Probandenkollektiv. Letztendlich können auch Unterschiede, die die Verarbeitung der Proben im Labor betreffen als Fehlerquelle nicht ausgeschlossen werden.

Die MFI von CD14 auf Monozyten zum Zeitpunkt $t=0$ h lag in der vorliegenden Studie bei KHK-Patienten wesentlich höher als in der Population der gesunden Kontrollprobanden. Die Kontrollprobanden waren bezüglich ihrer Grundcharakteristika nicht mit der Gruppe der KHK-Patienten gematcht. Es kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob die erhöhte MFI von CD14 bei den Probanden der Gruppe „KHK oTT“ Ausdruck tatsächlich ihrer kardiovaskulären Grunderkrankung ist. Ebenso kommen andere Variablen wie etwa des Alters als Ursache für eine veränderte Expression von mono-

zytären Oberflächenproteinen in Frage¹¹⁷. Die MFI von CD14 blieb bei den gesunden Probanden der Gruppe „Gesunde oTT“, die einen oTT durchführten, gleich, während sie bei Probanden der Gruppe „Gesunde nüchtern“, die nüchtern blieben, im Zeitverlauf sinkt (siehe Abb. 12 auf Seite 47). Möglicherweise moduliert also die Aufnahme von Triglyceriden die zirkadiane Rhythmik der Expression von CD14, indem sie einen morgendlichen Abfall verhindert. Interessanterweise sank aber auch die MFI von CD14 auf Monozyten von Probanden der Gruppe „KHK oTT“, die als KHK-Patienten einen oTT durchführten (siehe Abb. 21 auf Seite 57). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich hierbei möglicherweise um einen Effekt der Statineinnahme (90 % der Patienten) handelt¹⁰⁹.

Die Zusammensetzung der zirkulierenden Monozyten bezüglich ihrer Subpopulationen, die anhand der Expression von CD14 und CD16 definiert sind (siehe Seite 16 f. und Abb. 6 auf Seite 32), blieb sowohl 5 h nach der Aufnahme von Sahne als auch von Wasser unverändert. Auch konnte keine Korrelation zwischen den Serumlipiden und dem prozentualen Anteil dieser Subpopulationen an den Gesamtmonozyten beobachtet werden. Eine andere Studie hingegen beschreibt eine positive Korrelation zwischen CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten und der Cholesterinkonzentration im Plasma sowie der Plasmatriglyceridkonzentration¹⁰⁹. Diese geht jedoch mit einer großen Schwankungsbreite einher, was ihre Validität einschränkt.

Es konnte keine triglyceridbedingte Veränderung der monozytären Expression von IL6, IL1 β , MCP1 und TNF α beobachtet werden (siehe Abb. 15 auf Seite 51). Aufgrund dieses Negativbefundes wurde die Untersuchung der monozytären Genexpression in der Gruppe der Negativkontrolle nicht für notwendig erachtet.

Bezüglich der Expression von Chemokinrezeptoren auf zirkulierenden Monozyten ergab die vorliegende Arbeit, dass die Expression von CCR2 und CX3CR1 durch orale Triglyceridaufnahme beeinflusst wird. Die MFI beider Rezeptoren sank in der Gruppe der Negativkontrolle signifikant innerhalb der Beobachtungszeit. Nach oTT sinkt die MFI dieser Chemokinrezeptoren weniger stark. Postprandiale Triglyceride scheinen also die zirkadiane Expression von CCR2 und CX3CR1 zu modulieren und wirken so möglicherweise proatherogen.

Insgesamt bietet die vorliegende Arbeit jedoch wenig Anhalt für eine vermehrte Akti-

vierung zirkulierender Monozyten durch postprandialer Triglyceride.

5.2.4 Auswirkungen auf humorale Parameter

Die Literatur bietet bezüglich der postprandialen Reaktion proinflammatorischer, humoraler Parameter, ein äußerst heterogenes Bild. Tabelle 11 zeigt anhand von proatherogenen Molekülen im Serum beispielhaft, inwiefern Studienergebnisse variieren.

Parameter im Serum	Anzahl der Studien, die eine		
	steigende	gleichbleibende	fallende
sICAM	3 ^{12;19;86}	2 ^{67;111}	1 ⁹⁹
TNF α	3 ^{13;65;86}	2 ^{28;67}	1 ⁹⁹

Tabelle 11: Beispiele für die Heterogenität der Studienergebnisse

Es bleibt unklar, wieso verschiedene Studien mit ähnlicher Fragestellung zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Als Ursache kommen die oben aufgeführten methodischen Unterschiede in Betracht. Insbesondere Studien, deren Testmahlzeiten neben Triglyceriden relevante Mengen anderer Inhaltsstoffe enthalten, können ihre Beobachtungen nicht eindeutig auf die Triglyceridämie zurückführen. Hier kommen Kohlenhydrate und Proteine ebenso als Ursache für proatherogene Effekte in Betracht.

Des Weiteren wurde mehrfach beobachtet, dass proatherogene Effekte in Abhängigkeit vom Probandenkollektiv in unterschiedlicher Ausprägung auftreten. Beispielsweise wurde bei Patienten mit arterieller Hypertonie ein postprandialer Anstieg proinflammatorischer Moleküle im Serum beobachtet, der bei einer gesunden Kontrollpopulation nicht auftritt⁶⁵. Auch die Glucosetoleranz beeinflusst die Dynamik der postprandialen TNF α -Konzentration^{86;97}. Eine andere Studie beobachtete bei gesunden Probanden einen postprandialen Anstieg von Fractalkine im Serum. Bei KHK-Patienten bleibt die Fractalkinekonzentration gleich. Bei Patienten, bei denen sowohl KHK als auch Diabetes mellitus vorliegen, steigt die Fractalkinekonzentration an⁶⁹. Es bleibt jedoch zu evaluieren, welche pathophysiologische und prognostische Bedeutung solche Unterschiede haben.

Triglyceridabhängige Effekt auf humorale Parameter sind also offensichtlich sehr stör-anfällig. Die vorliegende Studie arbeitet mit einem Testgetränk, das außer Triglyceride keine potentiellen inflammatorischen Stimuli enthält. In der Gruppe „Gesunde oTT“ und II wurden gesunde Probanden betrachtet, die in ihren Grundcharakteristika eine geringe Variationsbreite zeigten. Anhand der in der vorliegenden Arbeit beobachteten humoralen Parameter konnte kein proinflammatorischer Effekt postprandialer Triglyceride dargestellt werden. Die Serumkonzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ als Indikator systemischer Inflammation und von sICAM als Indikator endothelialer Aktivierung zeigten nach oTT keine signifikante Veränderung. Auch bezüglich der Chemokine MCP1 und Fractalkine zeichnet sich keine triglyceridabhängige Veränderung der Serumkonzentration ab: Die Konzentration von MCP1 fällt sowohl bei den Probanden, die einen oTT durchführten als auch in der Gruppe der Negativkontrolle ab, die Konzentration von Fractalkine bleibt nach oTT gleich.

5.3 Implikationen für die Atheroskleroseforschung

5.3.1 Zirkulierende Monozyten als Surrogatparameter der Atherosklerose

Atherosklerotische Vorgänge können beim Menschen nur schwer sichtbar gemacht werden. Will man eine Aussage über atherogenes Geschehen treffen, nutzt man Surrogatparameter. Die pathophysiologische Bedeutung von Monozyten für die Atherosklerose ist unumstritten. Zirkulierende Monozyten passieren mit dem Blutkreislauf das Gefäßlumen, so dass sie als Reporter für atherosklerotische Vorgänge in Frage kommen. Allerdings zirkuliert nur ein kleiner Teil der Monozyten. Inwiefern die leicht zugänglichen peripheren Monozyten jedoch tatsächlich die aktiven, an der Atherogenese beteiligten Monozyten und Makrophagen repräsentieren, ist also weitestgehend unklar. Es liegen nur wenige Daten zu der Frage vor, inwiefern die Eigenschaften zirkulierender Monozyten Surrogatparameter der Atherosklerose geeignet sind.

Oberflächenmoleküle

Eine der Methoden, die eingesetzt werden, um den Aktivierungsgrad von Monozyten abzuschätzen, ist die Messung der Expression von Oberflächenmolekülen wie CD14 und CD11b. Letztendlich ist unklar, inwiefern eine solche Messung auf zirkulierenden Monozyten geeignet ist, um eine Aussage über die aktuelle atherosklerotische Aktivität der Gesamtmonozyten treffen zu können.

Bekannt ist, dass Patienten nach Myokardinfarkt eine höhere Expression von CD11b und CD14 auf ihren Monozyten zeigen als gleichaltrige Kontrollprobanden⁷⁸. Auch bei Diabetikern mit KHK wurde im Vergleich zu alters- und geschlechtsadjustierten Kontrollprobanden eine höhere CD14-Dichte auf zirkulierenden Monozyten nachgewiesen⁹⁵. Bei Patienten mit instabiler *Angina pectoris* konnte eine höhere CD11b-Expression auf Monozyten gezeigt werden, die aus dem Coronarsinus gewonnen wurden als auf Monozyten, die aus der Aorta gewonnen werden⁷⁶. Eine Studie hingegen, die Oberflächenmoleküle auf Monozyten von KHK-Patienten ohne akutes kardiovaskuläres Ereignis verglichen mit alters-, geschlechts- und medikationkontrollierten Patienten ohne KHK untersuchte, beschreibt eine gleiche MFI von CD14 für beide Gruppen und eine niedrigere MFI von CD11b bei den KHK-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe¹¹⁴.

Es ist also ersichtlich, dass viele verschiedene Faktoren die Expression von Oberflächenmolekülen auf zirkulierenden Monozyten beeinflussen. Ihre Messung ist also sehr wahrscheinlich nicht spezifisch für atherosklerotische Prozesse. Auch ist nicht bekannt, ob eine Korrelation der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf peripheren Monozyten und auf atherogenetisch aktiven Monozyten besteht. Es bleibt zu prüfen, ob die Bestimmung monozytärer Oberflächenmoleküle eine sensitive und Methode zur Erkennung atherosklerotischer Prozesse ist. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob es monozytäre Oberflächenmoleküle gibt, deren Expression spezifisch für die atherosklerotische Prozesse ist.

Monozytäre Subpopulationen

Die Bedeutung für das kardiovaskuläre Risiko der monozytären Subpopulationen, die bezüglich der Expression von CD14 und CD16 definiert sind, ist nur unvollständig geklärt.

Es gibt nur wenige klinischen Studien, die den prozentualen Anteil dieser Subpopulationen mit klinischen Daten korrelieren.

Für nierentransplantierte Patienten konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der CD14^{low}CD16^{pos}-Monozyten an allen Monozyten mit der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis als Indikator subklinischer Atherosklerose korreliert¹³¹. Diese Korrelation geht jedoch mit einer hohen Schwankungsbreite einher, so dass es diesbezüglich weiterer Untersuchungen bedarf. Eine weitere Studie konnte eine Korrelation zwischen der Intima-Media-Dicke und der Konzentration der CD16^{pos}-Monozyten herausarbeiten, welche jedoch nach Adjustierung für den BMI nicht bestehen blieb¹⁰³. Möglichweise besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Übergewicht, CD16^{pos}-Monozyten und Atherosklerose. Hier sind weitere pathophysiologische Untersuchungen notwendig.

Für Diabetespatienten wurde gezeigt, dass das Vorliegen einer KHK den prozentualen Anteil der CD16^{pos}-Monozyten nicht beeinflusst. Auch gegenüber einer Kontrollpopulation ohne Diabetes und ohne KHK lagen die CD16^{pos}-Monozyten in gleichen Anteilen vor⁹⁵. In einer anderen Studie wurde für KHK-Patienten ein im Mittel höherer prozentualer Anteil der CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten als bei gesunden Kontrollen gezeigt¹¹⁵. Die Differenz der Mittelwerte ist hierbei gering. Es bleibt also zu überprüfen, ob dieser signifikante Unterschied auch relevant und reproduzierbar ist.

Bei Dialysepatienten wurde der Anteil der CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse herausgearbeitet⁴⁹. Auch bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Dialyse waren die CD14^{high}CD16^{pos}-Monozyten mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert¹⁰².

Insgesamt ist bis heute nicht geklärt, welche Rolle die monozytären Subpopulationen für atherosklerotische Erkrankungen spielen. Insbesondere herrscht kein Konsens darüber, welche der anhand der Expression von CD14 und CD16 definierten Subpopulationen von Bedeutung ist. Diesbezüglich sind sowohl weitere pathophysiologische als auch klinische Untersuchungen notwendig.

Genexpression

Es erscheint plausibel, dass sich die Genexpression zirkulierender Monozyten und atherosklerotische Gefäßläsionen durch ihren direkten Kontakt miteinander gegenseitig beeinflussen. In der Tat wurde mehrfach gezeigt, dass das Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie das Vorliegen atherosklerotisch bedingter Krankheiten mit einer veränderten Genexpression in zirkulierenden Monozyten assoziiert sind^{56;114;141}.

Jedoch sind die diesbezüglichen Studienergebnisse nicht konkordant. So wird beispielsweise von dem *Finkel-Biskis-Jinkins-Osteosarcoma-Gen* einmal berichtet, es werde bei Patienten mit einer atherosklerotischen Grunderkrankung verstärkt exprimiert⁵⁶. Eine andere Studie hingegen findet die Expression dieses Gens bei KHK-Patienten supprimiert¹¹⁴.

Darüber hinaus ist bis heute unklar, inwiefern ein kausaler Zusammenhang zwischen der monozytären Genexpression und der Atherosklerose besteht. Es liegen keine Daten darüber vor, ob die Expression bestimmter Gene in zirkulierenden Monozyten einen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt. Es kann nicht beurteilt werden, ob die berichteten Alterationen der monozytären Genexpression Ursache oder Ausdruck atherosklerotischer Veränderungen sind. Auch liegt zum aktuellen Zeitpunkt kein Modell eines pathophysiologischen *pathways* unter Berücksichtigung der monozytären Genexpression vor. Diesbezüglich sind weitere molekularbiologische Untersuchungen und klinische Beobachtungen notwendig.

5.3.2 Postprandiale Mechanismen der Atherosklerose

Die vorliegende Arbeit konnte keinen deutlichen postprandialen, triglyceridabhängigen Effekt auf zirkulierende Monozyten und inflammatorische Cytokine etablieren. Nichtsdestotrotz geben epidemiologische Studien Hinweise darauf, dass die postprandialen Triglyceride einen kardiovaskulären Risikofaktor darstellen (siehe S. 18 f.). Bislang fehlen Daten prospektiver, kontrollierter Studien, die postprandiale Triglyceride als kardiovaskulären Risikofaktor validieren. Auch bezüglich der potentiellen postprandialen proatherogenen Mechanismen gibt es keine einhellige Meinung. Da es sich bei der Atherosklerose um eine

komplexe, multifaktorielle Pathologie handelt, kann man sich der Frage nach postprandialen proatherogenen Mechanismen von verschiedenen Seiten nähern.

Oxidativer Streß und endotheliale Dysfunktion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss postprandialer Triglyceride auf monozytäre und humorale inflammatorische Parameter der Atherosklerose. Andere potentielle postprandiale, proatherogene Effekte wie eine Aktivierung des Gefäßendothels und erhöhter oxidativer Stress wurden hier nicht betrachtet.

Endothelzellen regulieren über rezeptorvermittelte und nicht-rezeptorvermittelte Mechanismen den Vasotonus, Inflammation, Lipidmetabolismus, Zellwachstum und Zellmigration sowie die Interaktion mit der extrazellulären Matrix⁴¹. Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen insbesondere über oxidativen Streß zur Beeinträchtigung dieser Funktionen, also zur endothelialen Dysfunktion. Dieser Schritt bildet den Anfang des kardiovaskulären Kontinuums³². Eine nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der Endothelfunktion ist die Messung der flussabhängigen Vasodilatation¹⁸. Hierbei wird das Ausmaß der Vasodilatation bei postischämischer Hyperämie quantifiziert. Diese ist beim Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion beeinträchtigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von humanen Endothelzellen mit postprandialen triglyceridreichen Lipoproteinen deren Expression von Adhäsionsmolekülen und Selectinen steigert, im Gegensatz zu nativen triglyceridreichen Lipoproteinen⁸⁹. Das bedeutet, dass die Endothelfunktion *in vitro* durch postprandiale Triglyceride alteriert wird.

Auch *in vivo* konnte mittels der flussabhängigen Vasodilatation eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion infolge oraler Triglyceridbelastung gemessen werden^{6;20;39;70;72;89}. Dabei hält die Reaktion der flussabhängigen Vasodilatation auf orale Triglyceridbelastung bei Patienten mit einer nüchternen Triglyceridkonzentration über 180 mg/dl länger an als bei normolipämischen Probanden⁸⁹.

Es wird vermutet, dass die postprandiale Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch erhöhten oxidativen Stress hervorgerufen wird^{6;20}. Es wurde beobachtet, dass Leukozyten postprandial vermehrt Sauerstoffradikale produzieren. Diese korrelierte hierbei mit der

postprandialen Veränderung der Endothelfunktion⁶.

Die vorliegenden Studienergebnisse sprechen dafür, dass sich die Endothelfunktion durch postprandiale Triglyceride verschlechtert. Als Ursache hierfür kommen sowohl Veränderungen der Endothelzellen als auch ein erhöhter oxidativer Stress in Betracht. Als Verursacher des oxidativen Stresses kommen Leukozyten in Frage. Über welchen Mechanismus postprandiale Triglyceride zur leukozytären Produktion von Sauerstoffradikalen führen, ist noch nicht geklärt.

Monozytenmigration

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge wird die zirkadiane Rhythmik in der Expression von CCR2 und CX3CR1 auf zirkulierenden Monozyten durch postprandiale Triglyceride moduliert. Es stellt sich die Frage, inwiefern dies von funktioneller Bedeutung ist. Dazu muss das Migrationsverhalten von Monozyten in Abhängigkeit von oraler Triglyceridbelastung untersucht werden. Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten. Einerseits es möglich, Monozyten vor und nach oTT aus Vollblut zu isolieren. Diese Zellen werden dann in einen Migrationsassay eingesetzt. Bei dieser Methode ist nicht auszuschließen, dass die Zellen von Interesse bereits *in vivo* in eine atheromatöse Plaque migriert sind. Eine andere Untersuchungsmethode umgeht diese Fehlerquelle: Die Monozyten werden vor dem oTT aus Vollblut isoliert. Vor und nach oTT wird Serum oder Plasma gewonnen. Die nativen Monozyten werden mit den jeweiligen Plasmaproben inkubiert und anschließend in einem Migrationsassay eingesetzt. Bei dieser Methode bleibt zu prüfen, inwiefern postprandial gewonnenes triglyceridreiches Serum *in vitro* sich auf die monozytäre Expression von Chemokinrezeptoren auswirkt.

Sind postprandiale Triglyceride tatsächlich ein kardiovaskulärer Risikofaktor?

Es ist denkbar, dass nicht die postprandialen Triglyceride selbst einen Risikofaktor darstellen. Sie können ebenso Ausdruck anderer Risikofaktoren sein. Die gemessenen postprandialen Triglyceride in der „*Women's Health Study*“^{7;83} und der „*Copenhagen City Heart Study*“⁹⁰ entstanden nicht infolge einer standardisierten Triglyceridzufuhr. Die Nahrungsaufnahme geschah individuell. Die resultierenden postprandialen Triglyceridwerte

spiegeln also die individuellen Essgewohnheiten wider, welche möglicherweise ihrerseits Ausdruck eines kardiovaskulären Risikoverhaltens sind.

In der „*Women’s Health Study*“ wurden die Teilnehmerinnen gebeten, nüchtern zu erscheinen⁷. Die Daten für postprandiale Triglyceride wurden bei Frauen erhoben, die dieser Bitte nicht nachkamen. Es kann spekuliert werden, dass diese Probandinnen tendenziell eher *non-compliant* waren und sich somit von der Grundgesamtheit unterschieden. Dies wäre eine mögliche Ursache für eine Verzerrung der Daten.

Um zu ermitteln, inwiefern postprandiale Triglyceride einen kardiovaskulären Risikofaktor darstellen, sind prospektive Studien wie die „*Homburg Cream and Sugar Study*“ notwendig.

5.3.3 Zirkadiane Rhythmik proatherogener Parameter

In der Deutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde vielfach auf zirkadiane Rhythmen verwiesen.

Kardiovaskuläre Krankheiten werden durch zirkadiane Rhythmen beeinflusst. So treten kardiovaskuläre Ereignisse gehäuft am frühen Morgen auf^{22;85}. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass auch die Infarktgröße und die Ischämie–Reperfusionstoleranz in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Eintretens eines Infarktes abhängen³¹. Als Ursache hierfür werden sowohl extrinsische als auch intrinsische Faktoren angesehen. Zirkadiane Rhythmen sind für inflammatorische proatherogene Parameter wie zum Beispiel IL6 und TNF α ^{47;75;98} bedeutsam. Darüber hinaus konnten für glatte Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten tageszeitliche Schwankungen des Genexpressionmusters gezeigt werden¹⁴⁰. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass nach Ablation der kardiomyozytärer zirkadianen Uhr die tageszeitlichen Schwankungen der Ischämie–Reperfusionstoleranz verloren gehen³¹.

Interessanterweise zeigt auch der postprandiale Metabolismus tageszeitliche Schwankungen auf^{51;84}. Inwiefern die zirkadianen Rhythmen von kardiovaskulären Erkrankungen, proinflammatorischen Parametern und postprandialem Metabolismus zusammenhängen, ist unklar.

Zirkadiane Veränderungen des Differentialblutbildes

Zirkadiane Rhythmen das Differentialblutbild betreffend wurden bereits beschrieben, ohne in die klinische Praxis einzugehen^{47;82;125}. In der vorliegenden Studie begannen die Messungen zum Zeitpunkt $t=0$ h zwischen 7 Uhr und 8 Uhr und endeten fünf Stunden später, also zwischen 12 Uhr und 13 Uhr. Für diesen Zeitraum wurden tageszeitliche Schwankungen wie folgt beschrieben: Die neutrophilen Granulozyten steigen an, während die Lymphozyten und die Monozyten abfallen^{47;82}. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Tendenzen in der Dynamik der Konzentrationen der Leukozytenpopulationen stehen also im Einklang mit den beschriebenen tageszeitlichen Rhythmen. Die Ergebnisse der bereits genannten Studien, die sich mit den Auswirkungen postprandialer Triglyceride befassen^{2;91;92;93;94} unterscheiden sich von den Ergebnissen der vorliegenden Studie, indem sie einen fraglichen triglyceridabhängigen Anstieg der Lymphozyten beschreiben. Es ist nicht bekannt, in welchem Zeitraum diese Messungen durchgeführt wurden und ob der beschriebene Lymphozytenanstieg nicht möglicherweise Ausdruck des nachmittäglichen Anstieges ist⁴⁷.

Es ist bis heute nicht geklärt, welche pathophysiologische Bedeutung die tageszeitlichen Veränderungen des Differentialblutbildes für die Atherosklerose haben.

Chemokine und ihre Rezeptoren

Auch zirkadiane Rhythmen bezüglich der untersuchten Chemokine und ihrer Rezeptoren sind bislang noch nicht eingehend erforscht. Versuche an Peritonealmakrophagen von Mäusen deuten darauf hin, dass in diesen Zellen CCR2 kontinuierlich exprimiert wird, während die Expression seines Liganden MCP1 einem festen circadianen Rhythmus folgt⁴⁸. Bei Ratten konnten Hinweise auf eine tageszeitliche Rhythmik der MCP1-Konzentration im Plasma gefunden werden¹⁷.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Expression von CCR2 und CX3CR1 auf zirkulierenden Monozyten einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Sie fällt im Laufe des Vormittags ab. Im Zusammenhang mit oraler Aufnahme von Triglyceriden wurde dieser Abfall verhindert. Die Serumkonzentration von MCP1 scheint ebenfalls einer zirkadianen Rhythmik zu unterliegen, welche jedoch nicht durch Trigly-

ceridaufnahme beeinflusst wird. Es gibt bislang keinen Anhaltspunkt für tageszeitliche Schwankungen der Fractalkine-Konzentration im Serum.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die zirkadianen Rhythmen der Serumkonzentration von Chemokinen sowie der Expression ihrer Rezeptoren genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus bleibt die Frage offen, inwiefern solche tageszeitlichen Schwankungen und ihre Modulierbarkeit beispielsweise durch Triglyceride von pathophysiologischer Bedeutung sind.

Der Einfluss der Nahrungsaufnahme auf zirkadiane Rhythmen

Es gibt Hinweise, dass die Nahrungsaufnahme zirkadiane Rhythmen beeinflusst³⁷. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ratten die zirkadiane Rhythmik der Plasmakonzentrationen von Adiponectin, TNF α sowie MCP1 und in geringerem Ausmaß von IL1 und IL6 durch eine fettreiche Diät durchbrochen wird¹⁷. Beim Menschen konnte eine Modulation der IL6-Serumkonzentration durch die Aufnahme von Triglyceriden bislang nicht beobachtet werden^{28;94}. Versuche an Mäusen ergaben, dass das Ausmaß der Modulation zirkadianer Rhythmen durch Nahrungsaufnahme vom Zeitpunkt der Fütterung abhängt³⁸.

Die Aufnahme von Triglyceriden am Morgen scheint in Bezug auf einige Parameter, insbesondere die Chemokinrezeptorexpression auf Monozyten, zirkadiane Rhythmen modulieren zu können. Es bleibt unbekannt, ob es zu anderen Zeitpunkten des Tages Phasen gibt, in denen monozytäre und humorale inflammatorische Parameter sensibler auf orale Triglyceridbelastung reagieren. Solches zu untersuchen stellt eine große Herausforderung an das Studiendesign dar: Es ist schwierig, zu einem anderen Zeitpunkt als nach der Nachtruhe, Probanden in nüchternem Zustand zu rekrutieren. Bleiben die Probanden nicht nüchtern, so stellt die Nahrungsaufnahme vor dem Test einen Störfaktor dar. Bleiben die Patienten allerdings nüchtern, so ist nicht auszuschließen, dass die Nüchternphase selbst als Störvariable agiert. Man müsste also eine *Cross-over*-Studie durchführen, in der sich die Probanden einmal nüchtern und einmal nicht nüchtern einem oTT unterziehen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **Aiello R J, Bourassa P A, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins B J, Milos P M** (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1518–1525.
- [2] **Alipour A, van Oostrom A J H H M, Izraeljan A, Verseyden C, Collins J M, Frayn K N, Plokker T W M, Elte J W F, Cabezas M C** (2008). Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 792–797.
- [3] **Ancuta P, Moses A, Gabuzda D** (2004). Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology* 209: 11–20.
- [4] **Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw S K, Luscinskas F W, Gabuzda D** (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197: 1701–1707.
- [5] **Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos D A** (2008). IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6: 150–158.
- [6] **Bae J H, Bassenge E, Kim K B, Kim Y N, Kim K S, Lee H J, Moon K C, Lee M S, Park K Y, Schwemmer M** (2001). Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis* 155: 517–523.
- [7] **Bansal S, Buring J E, Rifai N, Mora S, Sacks F M, Ridker P M** (2007). Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 298: 309–316.
- [8] **Barath P, Fishbein M C, Cao J, Berenson J, Helfant R H, Forrester J S** (1990). Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 65: 297–302.
- [9] **Bazan J F, Bacon K B, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves D R, Zlotnik A, Schall T J** (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640–644.
- [10] **Beekhuizen H, Blokland I, van Tilburg A J C, Koning F, van Furth R** (1991). CD14 contributes to the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated endothelial cells. *J Immunol* 147: 3761–3767.

-
- [11] **Belge K U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L** (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536–3542.
- [12] **Bellido C, López-Miranda J, Blanco-Colio L M, Pérez-Martínez P, Muriana F J, Martín-Ventura J L, Marín C, Gómez P, Fuentes F, Egido J, Pérez-Jiménez F** (2004). Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr* 80: 1487–1491.
- [13] **Blackburn P, Després J P, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Couillard C** (2006). Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity (Silver Spring)* 14: 1747–1754.
- [14] **Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo I F** (1998). Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394: 894–897.
- [15] **Brånén L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S** (2004). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2137–2142.
- [16] **Burdge G C, Calder P C** (2005). Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 93: 3–9.
- [17] **Cano P, Cardinali D P, Ríos-Lugo M J, Fernández-Mateos M P, Toso C F R, Esquifino A I** (2009). Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating adipocytokines in rats. *Obesity (Silver Spring)* 17: 1866–1871.
- [18] **Celermajer D S, Sorensen K E, Gooch V M, Spiegelhalter D J, Miller O I, Sullivan I D, Lloyd J K, Deanfield J E** (1992). Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111–1115.
- [19] **Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Ros R D, Maier A, Esposito K, Giugliano D** (2004). Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 53: 701–710.
- [20] **Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Ros R D, Motz E** (2002). Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial

- hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 106: 1211–1218.
- [21] **Charo I F, Ransohoff R M** (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354: 610–621.
- [22] **Cohen M C, Rohtla K M, Lavery C E, Muller J E, Mittleman M A** (1997). Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol* 79: 1512–1516.
- [23] **Combadière C, Potteaux S, Gao J L, Esposito B, Casanova S, Lee E J, Debré P, Tedgui A, Murphy P M, Mallat Z** (2003). Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: 1009–1016.
- [24] **Cushing S D, Berliner J A, Valente A J, Territo M C, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz C J, Fogelman A M** (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5134–5138.
- [25] **Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R** (1998). Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 279: 1477–1482.
- [26] **Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore J R, Pepys M B** (2000). Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 321: 199–204.
- [27] **Devaraj S, Jialal I** (2008). Validation of the circulating monocyte being representative of the cholesterol-loaded macrophage: biomediator activity. *Arch Pathol Lab Med* 132: 1432–1435.
- [28] **Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen C L, Jialal I** (2008). High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism* 57: 867–870.
- [29] **Domoto K, Taniguchi T, Takaishi H, Takahashi T, Fujioka Y, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M** (2003). Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 171: 193–200.
- [30] **Dragu R, Huri S, Zuckerman R, Suleiman M, Mutlak D, Agmon Y, Kapeliovich M, Beyar R, Markiewicz W, Hammerman H, Aronson D**

-
- (2008). Predictive value of white blood cell subtypes for long-term outcome following myocardial infarction. *Atherosclerosis* 196: 405–412.
- [31] **Durgan D J, Pulinilkunnil T, Villegas-Montoya C, Garvey M E, Frangiannis N G, Michael L H, Chow C W, Dyck J R B, Young M E** (2010). Short communication: ischemia/reperfusion tolerance is time-of-day-dependent: mediation by the cardiomyocyte circadian clock. *Circ Res* 106: 546–550.
- [32] **Dzau V J, Antman E M, Black H R, Hayes D L, Manson J E, Plutzky J, Popma J J, Stevenson W** (2006). The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation* 114: 2850–2870.
- [33] **Eberly L E, Stamler J, Neaton J D, Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group** (2003). Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease. *Arch Intern Med* 163: 1077–1083.
- [34] **Elkind M S, Cheng J, Boden-Albala B, Rundek T, Thomas J, Chen H, Rabbani L E, Sacco R L** (2002). Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. *Stroke* 33: 31–37.
- [35] **Fong A M, Robinson L A, Steeber D A, Tedder T F, Yoshie O, Imai T, Patel D D** (1998). Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 188: 1413–1419.
- [36] **Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock H W** (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373–377.
- [37] **Froy O** (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 28: 61–71.
- [38] **Froy O, Chapnik N, Miskin R** (2009). Effect of intermittent fasting on circadian rhythms in mice depends on feeding time. *Mech Ageing Dev* 130: 154–160.
- [39] **Gaenger H, Sturm W, Neumayr G, Kirchmair R, Ebenbichler C, Ritsch A, Föger B, Weiss G, Patsch J R** (2001). Pronounced postprandial lipemia impairs endothelium-dependent dilation of the brachial artery in men. *Cardiovasc Res* 52: 509–516.

-
- [40] **Gandotra P, Miller M** (2008). The role of triglycerides in cardiovascular risk. *Curr Cardiol Rep* 10: 505–511.
- [41] **Gibbons G H, Dzau V J** (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330: 1431–1438.
- [42] **Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, Backer G D, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori S G, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Reimer W S O, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano J L, Walma E, Fitzgerald T, Cooney M T, Dudina A, Vahanian A, Camm J, Caterina R D, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Filippatos G, Hellems I, Kristensen S D, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano J L, Altiner A, Bonora E, Durrington P N, Fagard R, Giampaoli S, Hemingway H, Hakansson J, Kjeldsen S E, mogens Lytken Larsen, Mancia G, Manolis A J, Orth-Gomer K, Pedersen T, Rayner M, Ryden L, Sammut M, Schneiderman N, Stalenhoef A F, Tokgözoğlu L, Wiklund O, Zampelas A, European Society of Cardiology (ESC), European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (EACPR), Council on Cardiovascular Nursing, European Association for Study of Diabetes (EASD), International Diabetes Federation Europe (IDF-Europe), European Stroke Initiative (EUSI), Society of Behavioural Medicine (ISBM), European Society of Hypertension (ESH), and European Heart Network (EHN) W, European Atherosclerosis Society (EAS)** (2007). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14 Suppl 2: S1–113.
- [43] **Greaves D R, Häkkinen T, Lucas A D, Liddiard K, Jones E, Quinn C M, Senaratne J, Green F R, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg P L, Gordon S, Ylä-Herttualla S** (2001). Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 923–929.
- [44] **Gu L, Okada Y, Clinton S K, Gerard C, Sukhova G K, Libby P, Rollins B J** (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2: 275–281.

-
- [45] **Hansson G K, Jonasson L, Seifert P S, Stemme S** (1989). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9: 567–578.
- [46] **Hansson G K, Robertson A K L, Söderberg-Nauclér C** (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 1: 297–329.
- [47] **Haus E, Smolensky M H** (1999). Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 16: 581–622.
- [48] **Hayashi M, Shimba S, Tezuka M** (2007). Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull* 30: 621–626.
- [49] **Heine G H, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Köhler H, Girndt M** (2008). CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73: 622–629.
- [50] **Häkkinen T, Karkola K, Ylä-Herttuala S** (2000). Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII). *Virchows Arch* 437: 396–405.
- [51] **Holmbäck U, Forslund A, Forslund J, Hambraeus L, Lennernäs M, Lowden A, Stridsberg M, Akerstedt T** (2002). Metabolic responses to nocturnal eating in men are affected by sources of dietary energy. *J Nutr* 132: 1892–1899.
- [52] **Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall T J, Yoshie O** (1997). Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91: 521–530.
- [53] **Jacobs D R, Barrett-Connor E** (1982). Retest reliability of plasma cholesterol and triglyceride. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol* 116: 878–885.
- [54] **Jeppesen J, Hein H O, Suadicani P, Gyntelberg F** (1998). Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 97: 1029–1036.
- [55] **Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Båvenholm P, Ericsson C G, Godsland I, de Faire U, Nilsson J** (1998). Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 47: 113–118.

-
- [56] **Kang J G, Patino W D, Matoba S, Hwang P M** (2006). Genomic analysis of circulating cells: a window into atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 16: 163–168.
- [57] **Kannel W B, Wilson P W** (1992). Efficacy of lipid profiles in prediction of coronary disease. *Am Heart J* 124: 768–774.
- [58] **Klinke R, Pape H C, Silbernagel S** (2005). Physiologie. Thieme, Stuttgart, 5. komplett überarbeitete Auflage.
- [59] **Landmann R, Knopf H P, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W** (1996). Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64: 1762–1769.
- [60] **Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim K W, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira S A, Weissman I L, Weber C, Jung S** (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113: 963–972.
- [61] **Lesnik P, Haskell C A, Charo I F** (2003). Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111: 333–340.
- [62] **Ley K, Laudanna C, Cybulsky M I, Nourshargh S** (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689.
- [63] **Ley K, Miller Y I, Hedrick C C** (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1506–1516.
- [64] **Libby P** (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868–874.
- [65] **Liu L, Zhao S P, Wen T, Zhou H N, Hu M, Li J X** (2008). Postprandial hypertriglyceridemia associated with inflammatory response and procoagulant state after a high-fat meal in hypertensive patients. *Coron Artery Dis* 19: 145–151.
- [66] **Lusis A J** (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407: 233–241.
- [67] **MacEneaney O J, Harrison M, O’Gorman D J, Pankratieva E V, O’Connor P L, Moyna N M** (2009). Effect of prior exercise on postprandial lipemia and markers of inflammation and endothelial activation in normal weight and overweight adolescent boys. *Eur J Appl Physiol* 106: 721–729.
- [68] **Madjid M, Awan I, Willerson J T, Casscells S W** (2004). Leukocyte count and coronary heart disease: implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 44: 1945–1956.

-
- [69] **Maegdefessel L, Schlitt A, Pippig S, Schwaab B, Fingscheidt K, Raaz U, Buerke M, Loppnow H** (2009). Patients with insulin-dependent diabetes or coronary heart disease following rehabilitation express serum fractalkine levels similar to those in healthy control subjects. *Vasc Health Risk Manag* 5: 849–857.
- [70] **Maggi F M, Raselli S, Grigore L, Redaelli L, Fantappiè S, Catapano A L** (2004). Lipoprotein remnants and endothelial dysfunction in the postprandial phase. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2946–2950.
- [71] **Mangan D F, Welch G R, Wahl S M** (1991). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 146: 1541–1546.
- [72] **Marchesi S, Lupattelli G, Schillaci G, Pirro M, Siepi D, Roscini A R, Pasqualini L, Mannarino E** (2000). Impaired flow-mediated vasoactivity during post-prandial phase in young healthy men. *Atherosclerosis* 153: 397–402.
- [73] **Masuda J, Ross R** (1990). Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 10: 178–187.
- [74] **Mathers C D, Loncar D** (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3: e442.
- [75] **Maury E, Ramsey K M, Bass J** (2010). Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* 106: 447–462.
- [76] **Mazzone A, Servi S D, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G** (1993). Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 88: 358–363.
- [77] **Meerschaert J, Furie M B** (1995). The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol* 154: 4099–4112.
- [78] **Meisel S R, Shapiro H, Radnay J, Neuman Y, Khaskia A R, Gruener N, Pauzner H, David D** (1998). Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging. *J Am Coll Cardiol* 31: 120–125.

-
- [79] **Miller L J, Bainton D F, Borregaard N, Springer T A** (1987). Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest* 80: 535–544.
- [80] **Miller M, Stone N J, Ballantyne C, Bittner V, Criqui M H, Ginsberg H N, Goldberg A C, Howard W J, Jacobson M S, Kris-Etherton P M, Lennie T A, Levi M, Mazzone T, Pennathur S, American Heart Association Clinical Lipidology, Thrombosis, and Prevention Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease** (2011). Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123: 2292–2333.
- [81] **Miller Y I, Viriyakosol S, Binder C J, Feramisco J R, Kirkland T N, Witztum J L** (2003). Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 278: 1561–1568.
- [82] **Mills J N** (1966). Human circadian rhythms. *Physiol Rev* 46: 128–171.
- [83] **Mora S, Rifai N, Buring J E, Ridker P M** (2008). Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 118: 993–1001.
- [84] **Morgan L, Hampton S, Gibbs M, Arendt J** (2003). Circadian aspects of postprandial metabolism. *Chronobiol Int* 20: 795–808.
- [85] **Muller J E, Tofler G H, Stone P H** (1989). Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* 79: 733–743.
- [86] **Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari A M, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D** (2002). Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 39: 1145–1150.
- [87] **National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)** (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106: 3143–3421.

-
- [88] **Nelken N A, Coughlin S R, Gordon D, Wilcox J N** (1991). Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88: 1121–1127.
- [89] **Norata G D, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, Eriksson P, Catapano A L** (2007). Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis* 193: 321–327.
- [90] **Nordestgaard B G, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A** (2007). Non-fasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298: 299–308.
- [91] **van Oostrom A J H H M, Plokker H W M, van Asbeck B S, Rabelink T J, van Kessel K P M, Jansen E H J M, Stehouwer C D A, Cabezas M C** (2006). Effects of rosuvastatin on postprandial leukocytes in mildly hyperlipidemic patients with premature coronary sclerosis. *Atherosclerosis* 185: 331–339.
- [92] **van Oostrom A J H H M, Rabelink T J, Verseyden C, Sijmonsma T P, Plokker H W M, Jaegere P P T D, Cabezas M C** (2004). Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 177: 175–182.
- [93] **van Oostrom A J H H M, Sijmonsma T P, Rabelink T J, Asbeck B S V, Cabezas M C** (2003). Postprandial leukocyte increase in healthy subjects. *Metabolism* 52: 199–202.
- [94] **van Oostrom A J H H M, Sijmonsma T P, Verseyden C, Jansen E H J M, de Koning E J P, Rabelink T J, Cabezas M C** (2003). Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 44: 576–583.
- [95] **Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H W** (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527–2534.
- [96] **Patiño R, Ibarra J, Rodriguez A, Yagüe M R, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A** (2000). Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 85: 1288–1291.
- [97] **Patsch J R, Miesenböck G, Hopferwieser T, Mühlberger V, Knapp E, Dunn J K, Gotto A M, Patsch W** (1992). Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* 12: 1336–1345.

-
- [98] **Payette C, Blackburn P, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Després J P, Couillard C** (2009). Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and C-reactive protein concentrations. *Metabolism* 58: 1593–1601.
- [99] **Petrovsky N, McNair P, Harrison L C** (1998). Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 10: 307–312.
- [100] **Plat J, Jellema A, Ramakers J, Mensink R P** (2007). Weight loss, but not fish oil consumption, improves fasting and postprandial serum lipids, markers of endothelial function, and inflammatory signatures in moderately obese men. *J Nutr* 137: 2635–2640.
- [101] **Randolph G J** (2009). The fate of monocytes in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 28–30.
- [102] **Ridker P M, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E** (2000). Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 101: 2149–2153.
- [103] **Rogacev K S, Seiler S, Zawada A M, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine G H** (2011). CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32: 84–92.
- [104] **Rogacev K S, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Creemers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Köhler H, Fliser D, Girndt M, Heine G H** (2010). Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 31: 369–376.
- [105] **Rosenson R S, Huskin A L, Wolff D A, Helenowski I B, Rademaker A W** (2008). Fenofibrate reduces fasting and postprandial inflammatory responses among hypertriglyceridemia patients with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 198: 381–388.
- [106] **Ross R** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801–809.
- [107] **Ross R** (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57: 791–804.
- [108] **Ross R** (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115–126.
- [109] **Rossi D, Zlotnik A** (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 217–242.

-
- [110] **Rothe G, Herr A S, Stöhr J, Abletshauser C, Weidinger G, Schmitz G** (1999). A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 144: 251–261.
- [111] **van Royen N, Hoefler I, Böttinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Buschmann I, Piek J J** (2003). Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res* 92: 218–225.
- [112] **Rubin D, Claas S, Pfeuffer M, Nothnagel M, Foelsch U R, Schrezenmeier J** (2008). s-ICAM-1 and s-VCAM-1 in healthy men are strongly associated with traits of the metabolic syndrome, becoming evident in the postprandial response to a lipid-rich meal. *Lipids Health Dis* 7: 32.
- [113] **Sampson M J, Davies I R, Brown J C, Ivory K, Hughes D A** (2002). Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1187–1193.
- [114] **Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt S M, Khaw K T, Gudnason V** (2007). Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 115: 450–458.
- [115] **Schirmer S H, Fledderus J O, van der Laan A M, van der Pouw-Kraan T C T M, Moerland P D, Volger O L, Baggen J M, Böhm M, Piek J J, Horrevoets A J G, van Royen N** (2009). Suppression of inflammatory signaling in monocytes from patients with coronary artery disease. *J Mol Cell Cardiol* 46: 177–185.
- [116] **Schlitt A, Heine G H, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide J F, Bickel C, Lackner K J, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht H J** (2004). CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost* 92: 419–424.
- [117] **Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B** (2009). How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 102: 215–222.
- [118] **Seidler S, Zimmermann H W, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F** (2010). Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol* 11: 30.

-
- [119] **Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond M G, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A** (2002). Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* 23: 376–383.
- [120] **Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J** (2008). Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152–159.
- [121] **Sprague A H, Khalil R A** (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78: 539–552.
- [122] **Statisches Bundesamt**. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content100/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml>. *abgerufen am 18/12/2011* .
- [123] **Statisches Bundesamt** (2011). Fachserie 12 Reihe 4 Todesursachen in Deutschland 2010. Wiesbaden.
- [124] **Sullivan G W, Sarembock I J, Linden J** (2000). The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 67: 591–602.
- [125] **Swirski F K, Pittet M J, Kircher M F, Aikawa E, Jaffer F A, Libby P, Weissleder R** (2006). Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10 340–10 345.
- [126] **Swoyer J, Irvine P, Sackett-Lundeen L, Conlin L, Lakatua D J, Haus E** (1989). Circadian hematologic time structure in the elderly. *Chronobiol Int* 6: 131–137.
- [127] **Tacke F, Alvarez D, Kaplan T J, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira S A, Habenicht A J, Randolph G J** (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117: 185–194.
- [128] **Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS), Catapano A L, Reiner Z, Backer G D, Graham I, Taskinen M R, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman M J, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi P P, Riccardi G, Storey R F, Wood D, E S C Committee for Practice Guidelines 2008-2010 and 2010-2012 Committees** (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the

- Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 217 Suppl 1: S1–44.
- [129] **Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos J C, Kolbeck R, Breslow J L** (2004). Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17 795–17 800.
- [130] **Thannickal V J, Fanburg B L** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005–L1028.
- [131] **Tipping P G, Hancock W W** (1993). Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* 142: 1721–1728.
- [132] **Ulrich C, Heine G H, Gerhart M K, Köhler H, Girndt M** (2008). Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. *Am J Transplant* 8: 103–110.
- [133] **Vaddi K, Newton R C** (1994). Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 153: 4721–4732.
- [134] **Vasan R S** (2006). Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 113: 2335–2362.
- [135] **Vassalli P** (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10: 411–452.
- [136] **W R I T I N G GROUP MEMBERS, Lloyd-Jones D, Adams R J, Brown T M, Carnethon M, Dai S, Simone G D, Ferguson T B, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho P M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M M, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger V L, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N D, Wylie-Rosett J, American Heart Association Statistics Committee, Stroke Statistics Subcommittee** (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics–2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: 948–954.
- [137] **Wang J M, Walter S, Mantovani A** (1990). Re-evaluation of the chemotactic activity of tumour necrosis factor for monocytes. *Immunology* 71: 364–367.

-
- [138] **Weber C, Belge K U, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber K S, Ziegler-Heitbrock H W** (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 67: 699–704.
- [139] **Weber C, Erl W, Weber P C** (1995). Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 621–628.
- [140] **Werner C, Groenewold S, Fritsch M, Filmer A, Kronenberg N, Marcu C, Böhm M, Laufs U** (2010). [Abstracts of the 76th Annual Meeting of the German Society of Cardiology-Heart and Circulatory Research. April 8-10, 2010. Mannheim] P169 - Bestimmung der post-prandialen Triglyzerid- und Glukosetoleranz mit Hilfe eines sequentiellen metabolischen Provokationstests bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit. *Clin Res Cardiol* 99 Suppl 1: 1.
- [141] **Young M E** (2006). The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1–16.
- [142] **Zeller T, Wild P, Szymczak S, Rotival M, Schillert A, Castagne R, Maouche S, Germain M, Lackner K, Rossmann H, Eleftheriadis M, Sinning C R, Schnabel R B, Lubos E, Mennerich D, Rust W, Perret C, Proust C, Nicaud V, Loscalzo J, Hübner N, Tregouet D, Münzel T, Ziegler A, Tired L, Blankenberg S, Cambien F** (2010). Genetics and beyond—the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS One* 5: e10693.
- [143] **Ziegler-Heitbrock H W** (2000). Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 67: 603–606.
- [144] **Ziegler-Heitbrock H W, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A** (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23: 2053–2058.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
Apo.	Apolipoprotein
BSA	bovines Serumalbumin; <i>body surface area</i>
CAD	<i>coronary artery disease</i>
CD	<i>cluster of differation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleine acid</i>
CRP	C-reaktives Protein
DNA	<i>desoxyribonucleine acid</i>
dTNP	<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein isocyanat
FKN	Fractalkine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HCS	<i>Homburg Cream and Sugar Study</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
IL	Interleukin
kcal	Kilokalorie
KHK	Koronare Herzkrankheit
kJ	Kilojoule
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar

MAC-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
MCP	<i>monocyte chemotractant protein</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
mmLDL	minimal modifiziertes LDL
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
oTT	oraler Triglyceridtoleranztest
oxLDL	oxidiertes LDL
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
RNA	<i>ribonucleine acid</i>
SE	<i>standard error</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

8 Veröffentlichungen

Abstracts:

- **S.H. Schirmer, C. Werner, S. Binder, M. Faas, M. Böhm, U. Laufs (2011):** Effects of omega-3 fatty acids on post-prandial triglyceride tolerance and monocyte activation.
Posterpräsentation Scientific Sessions of the American Heart Association, Orlando, FL
- **S.H. Schirmer, M. Faas, C. Werner, M. Böhm, U. Laufs (2010):** Effects of postprandial triglycerides on monocyte function.
Posterpräsentation 32. Annual Congress of the European Society of Cardiology, Stockholm, Schweden
- **S.H. Schirmer, M. Faas, C. Werner, M. Böhm, U. Laufs (2010):** Charakterisierung der Wirkung des postprandialen Triglyzerid-Anstiegs auf die Monozytenfunktion.
Posterpräsentation Annual congress of the Germany Society of Cardiology, Mannheim

Zur Publikation eingereicht:

- **S.H. Schirmer MD PhD, C. Werner MD, S. Binder, M. Faas, M. Böhm MD, U. Laufs MD:** Effects of omega 3 fatty acids on postprandial triglycerides and monocyte activation

9 Dank

Bei Herrn Professor Dr. med Böhm bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Innere Medizin III der Universitätsklinik des Saarlandes erarbeiten zu können.

Bei Herrn Professor Dr. med Ulrich Laufs bedanke ich mich, da er mir mit der Überlassung dieses Themas die Möglichkeit gegeben hat, die wissenschaftliche Arbeit kennen zu lernen. Vielen Dank auch für die Unterstützung meiner Arbeit in Wort und Tat

Bei Herrn Dr. Dr. med. Stephan H. Schirmer bedanke ich mich für eine exzellente Betreuung, seine Bereitschaft zum Dialog und seine tatkräftige Hilfe auf allen Ebenen.

Bei Herrn Dr. med Christian Werner sowie bei Anja Filmer, Marco Fritsch, Stephanie Groenewold und Nadine Kronenberg bedanke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der HCS-Studie.

Bei den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes, insbesondere bei Frau Ellen Becker und Frau Simone Jäger, bedanke ich mich für ihre Geduld und die gute Unterstützung bei allen praktischen Fragen des Laborlebens.

Insbesondere bedanke ich mich bei allen Probanden, ohne deren Mitarbeit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei meiner Familie und Georges bedanke ich mich für ihre Liebe und ihr Vertrauen.