

**Aus der**  
**Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten**  
**Universitätsklinikum des Saarlandes**  
**Homburg/Saar**  
**Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Danilo Fliser**

---

**MONOZYTENHETEROGENITÄT**  
**UND**  
**SUBKLINISCHE ATHEROSKLEROSE**

**DISSERTATION**  
**ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN**  
**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT**  
**DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2008**

**vorgelegt von Kyrill Rogačev**  
**geboren am 08. März 1980 in Ellwangen/Jagst**



# INHALTSVERZEICHNIS

---

INHALTSVERZEICHNIS .....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	6
1 ZUSAMMENFASSUNG .....	8
1.1 Deutsche Zusammenfassung .....	8
1.2 Summary.....	10
2 EINLEITUNG.....	12
2.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur Atherosklerose .....	12
2.2 Früherkennung von Atherosklerose mittels neuer Surrogatmarker.....	13
2.3 Leukozyten als zelluläre Marker von Atherosklerose .....	14
2.4 Monozyten-Makrophagen-System.....	15
2.5 Zielsetzung der Arbeit .....	16
3 MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Materialien.....	18
3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.2 Geräte.....	19
3.1.3 Monoklonale Antikörper .....	20
3.1.4 Substanzen .....	20
3.1.5 Puffer und Medien .....	21
3.2 Methoden .....	22
3.2.1 Klinischer Teil .....	22
3.2.2 Immunologisch-experimenteller Teil .....	28
3.3 Datenverarbeitung und statistische Auswertung .....	31

4	ERGEBNISSE .....	32
4.1	Charakteristika des Studienkollektivs .....	32
4.1.1	Kardiovaskuläres Risikoprofil .....	32
4.1.2	Intima-Media-Dicke in der I LIKE HOME Studie.....	34
4.2	Zusammenhang zwischen Leukozyten, Monozyten, Monozytenheterogenität und kardiovaskulären Risikofaktoren .....	39
4.2.1	Gesamtleukozyten, Neutrophile, Gesamtmonozyten, CD16- Monozyten und kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	39
4.2.2	CD16+ Monozyten und kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	39
4.2.3	Gesamtleukozyten, Gesamtmonozyten, CD16- Monozyten, CD16+ Monozyten und Rauchen.....	40
4.3	Gesamtleukozyten, Neutrophile, Gesamtmonozyten und Intima-Media-Dicke.....	40
4.4	Intima-Media-Dicke und CD16+ Monozyten: CD14++CD16+ und CD14+CD16+ Monozyten .....	41
5	DISKUSSION.....	45
5.1	Bedeutung von Monozyten in der Atherosklerose .....	45
5.2	Biologie CD16+ Monozyten.....	46
5.3	Monozytenheterogenität und subklinische Atherosklerose .....	49
5.4	Limitationen.....	53
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	54
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	56
7	DANKSAGUNG .....	62
8	PRÄSENTATIONEN .....	64
9	ANHANG .....	65
9.1	Tabellenverzeichnis .....	65

9.2	Abbildungsverzeichnis .....	65
9.3	Fragebogen .....	66
10	LEBENS LAUF .....	73

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A.; Aa.	Arterie; Arterien
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
BD	Becton Dickinson
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
D	Bundesrepublik Deutschland
dest.	Destilliert
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alia
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	Forward scatter
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HDL	High density lipoprotein
HF	Herzfrequenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin

KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
N	Anzahl
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
RR	Riva-Rocci Blutdruckmessung
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SSC	Sideward scatter
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
V.; Vv.	Vene; Venen
vgl.	Vergleiche
vs	Versus

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

---

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

---

### Einleitung

Monozyten und Makrophagen sind die wichtigsten Zellen des Immunsystems in der Atherosklerose. Monozyten, die zirkulierenden Vorläufer der Makrophagen, zeichnen sich durch eine beträchtliche immunphänotypische und funktionelle Heterogenität aus.

Bislang wurde die Monozytenheterogenität im Zusammenhang mit subklinischer Atherosklerose in keiner Studie beim Menschen untersucht.

### Methodik

In der vorliegenden Arbeit, welche einen Teilaspekt der I LIKE HOME Studie (Inflammation, Lipid Metabolism and Kidney Disease in Early Atherogenesis - The Homburg Evaluation) darstellt, wurden im Rahmen einer Querschnittsstudie 622 kardiovaskulär gesunde Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert. Die Intima-Media-Dicke wurde als Marker der subklinischen Atherosklerose gemessen, das Vorhandensein traditioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren überprüft und durchflusszytometrisch die Monozytenheterogenität mittels der Oberflächenmarker CD14 und CD16 untersucht. Differenziert werden konnte zwischen CD16- (=CD14++CD16-) und CD16+ (=CD14++CD16+ und CD14+CD16+) Monozyten.

### Ergebnisse

Die Studienpopulation stellt ein kardiovaskuläres Niedrig-Risikokollektiv dar (63,4% Frauen, Durchschnittsalter  $42 \pm 8$  Jahre). Weder Gesamtmonozytenzahlen, noch CD16-Monozyten korrelieren mit der Intima-Media-Dicke, oder traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren.

Allerdings zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der IMT und CD16+ Monozyten ( $r=0,137$ ;  $p=0,001$ ). Weiterhin korrelieren CD16+ Monozyten mit den

kardiovaskulären Risikofaktoren Alter ( $r=0,125$ ;  $p=0,003$ ), BMI ( $r=0,220$ ;  $p<0,001$ ), mittlerer Blutdruck ( $r=0,182$ ;  $p<0,001$ ), und invers mit dem HDL-Cholesterin ( $r=-0,100$ ;  $p=0,016$ ). Die genaue Unterteilung der CD16+ Monozyten in CD14++CD16+ Monozyten und CD14+CD16+ Monozyten zeigt, dass nur letztere mit der Intima-Media-Dicke und Risikofaktoren korrelieren.

### **Schlussfolgerung**

Bei der vorliegenden Arbeit, handelt es sich um die ersten Daten, welche eine Assoziation zwischen subklinischer Atherosklerose und einer spezifischen Monozytensubpopulation aufzeigen. CD16+ Monozyten zeichnen sich durch ihre hohe Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus. Darüber hinaus kommt es zu einem Anstieg der CD16+ Zellzahlen bei zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen. Diese Monozytensubpopulation besitzt weiterhin eine hohe endotheliale Affinität und einen großen Stellenwert in der Immunabwehr. Kürzlich konnte in tierexperimentellen Arbeiten die Rolle der Monozytenheterogenität in der Atherosklerose aufgezeigt werden. Die vorliegende Arbeit transferiert diese Erkenntnisse über den inflammatorischen Prozess der Atherosklerose vom Tiermodell auf den Menschen. CD16+ Monozyten könnten zukünftig Ziele therapeutischer Intervention werden.

## 1.2 Summary

---

### Introduction

Monocytes and monocyte-derived macrophages are the cellular hallmark in the initiation and further progression of atherosclerosis. Monocytes display immunophenotypic heterogeneity with functionally distinct subpopulations. So far no study investigated monocyte subpopulations in human early atherogenesis. We initiated the I LIKE HOME study to examine monocyte heterogeneity in subclinical atherosclerosis.

### Methods

The subsequent work, which is part of the I LIKE HOME study (Inflammation, Lipid Metabolism and Kidney Disease in Early Atherogenesis - The Homburg Evaluation), recruited 622 healthy employees of the Saarland University Hospital. We measured carotid intima-media-thickness (IMT) and checked for the presence of traditional cardiovascular risk factors. Via flow-cytometry, monocytes were differentiated into CD16- (=CD14++CD16-) and CD16+ cells, which were further subdivided into CD14++CD16+ and CD14+CD16+ cells.

### Results

The I LIKE HOME study consisted of a low risk population (63.4% female, mean age 42±8 years). Total or CD16- monocytes were neither correlated with IMT, nor with traditional risk factors.

However, we found a significant correlation between IMT and CD16+ monocytes ( $r=0,137$ ;  $p=0,001$ ). Furthermore, CD16+ monocytes correlated with the cardiovascular risk factors age ( $r=0,125$ ;  $p=0,003$ ), BMI ( $r=0,220$ ;  $p<0,001$ ), mean blood pressure ( $r=0,182$ ;  $p<0,001$ ), and inversely with HDL-cholesterol ( $r=-0,100$ ;  $p=0,016$ ). When further differentiating CD16+ monocytes into CD14++CD16+ and CD14+CD16+ cells, only the latter subset was correlated with IMT and traditional risk factors.

## **Conclusion**

For the first time, we describe an association between subclinical atherosclerosis and a specific monocyte subset. CD16<sup>+</sup> monocytes are potent producers of proinflammatory cytokines. Their cell count increases in numerous inflammatory conditions. Furthermore they show high endothelial affinity and are highly committed to immune surveillance. Recent animal studies established the role of monocyte heterogeneity in atherosclerosis. With this study we provide translational evidence for the specific role of CD16<sup>+</sup> monocytes in the inflammatory disorder atherosclerosis. CD16<sup>+</sup> monocytes might become potential therapeutic targets.

## 2 EINLEITUNG

---

### 2.1 Allgemeine Vorbemerkungen zur Atherosklerose

---

Atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen sind in Deutschland die häufigste Todesursache (*www.destatis.de*). Global gesehen werden die Folgen von Atherosklerose auch in den kommenden Dekaden den Hauptanteil an den Todesursachen in den Industrienationen darstellen. Obwohl die Behandlung atherosklerotischer Folgeerkrankungen, etwa des akuten Koronarsyndrom und des ischämischen Schlaganfalles in den letzten Jahren immer erfolgreicher wurde, gibt es noch wesentlichen Nachholbedarf bei der effektiven Prävention der Krankheit. Vor allem die Primärprävention ist im Vergleich zur Sekundärprävention wenig effizient.

Eine erfolgreiche Primärprävention der Atherogenese setzt ein besseres Verständnis der pathogenetischen Mechanismen voraus, welche zur Entstehung atherosklerotischer Veränderungen führen.

In den letzten zwei Dekaden kam es zu einem Paradigmenwechsel im Verständnis der Atherogenese. Vor der Veröffentlichung von Ross wurde die Atherosklerose, ausgehend von den traditionellen Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, vornehmlich als ein Prozess der passiven Lipidakkumulation in der Gefäßwand begriffen. Im Jahre 1999 jedoch, postulierte Ross, dass es sich bei der Atherosklerose um eine inflammatorische Erkrankung handle, bei welcher Entzündungsvorgänge wesentliche Mechanismen der Initiierung, Unterhaltung und Propagierung der Atherosklerose seien (Ross, 1999).

In den folgenden Jahren führte die Betrachtung von Entzündungsvorgängen in der Atherogenese zu neuen Einblicken in die involvierten Pathomechanismen und sekundär auch zur Etablierung von neuen Markern der Atherosklerose, vornehmlich Markern der Inflammation. Diese neuen Biomarker werden oft auch als Surrogat Marker bezeichnet.

Die konventionellen Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus werden den Surrogat Markern immer noch in ihrer Wertigkeit vorangestellt.

## **2.2 Früherkennung von Atherosklerose mittels neuer Surrogatmarker**

---

Als inflammatorische Surrogatmarker wurden in epidemiologischen Arbeiten zumeist Akut-Phase Proteine untersucht. Vor allem für das C-reaktive Protein (CRP), das mittels hoch sensitiver („hs“) Assays gemessen wird, konnte in einigen Studien ein zusätzlicher prognostischer Wert über den Framingham Risk Score, in dem aus den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse errechnet wird, gezeigt werden.

So konnten Ridker et al. in einer prospektiven Studie nachweisen, dass die „baseline“ CRP-Plasmakonzentration bei anscheinend gesunden Männern das Risiko für die Entwicklung eines ersten Herzinfarktes bzw. eines ischämisch bedingten Schlaganfalles vorhersagt. Die CRP-Plasmakonzentration blieb auch nach Korrektur für etablierte Risikofaktoren ein unabhängiger Prädiktor (Ridker et al., 1997).

Deshalb haben das „Center for Disease Control and Prevention“ sowie die „American Heart Association“ im Jahre 2003 die Empfehlung ausgesprochen, zusätzlich zu etablierten Risikofaktoren auch CRP-Serumkonzentrationen als Risikomarker der Atherogenese zu messen, zumal im klinischen Alltag die Erfassung der Plasmakonzentrationen von CRP gemessen als hs-CRP dank der kommerziell verfügbaren Assays in ausreichend standardisierter Form und Genauigkeit möglich ist (Ridker et al., 2004). Allerdings erfolgte diese Empfehlung unter der Einschränkung, dass die Datenlage teilweise noch kontrovers ist, und es wurden weitere Studien zur Klärung gefordert (Pearson et al., 2003). In der Folge beurteilten Danesh et al. in einer Metaanalyse im Jahr 2004 das CRP lediglich als moderaten Prädiktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (Danesh et al., 2004).

Der Stellenwert der CRP-Messung wird zum einen dadurch eingeschränkt, dass im

klinischen Alltag nur wenig zusätzliche Information gewonnen wird (Wang et al., 2006).

### **2.3 Leukozyten als zelluläre Marker von Atherosklerose**

---

Ähnlich wie die Bestimmung des CRP ist auch die Messung von Gesamtleukozyten und Leukozytensubpopulationen als Marker eines inflammatorischen Prozesses in standardisierter Form und Genauigkeit möglich. Darüber hinaus besitzen zelluläre Marker anders als das CRP eine unzweifelhafte Relevanz in der Pathogenese (Hansson, 2005). In einer Anzahl von epidemiologischen Studien wurde die Gesamtleukozytenzahl auf ihren Nutzen als Risikomarker untersucht (Madjid et al., 2004). Dabei zeigen fast alle prospektiven Untersuchungen, dass eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl mit einer vermehrten Inzidenz von koronarer Herzkrankheit und ischämisch bedingtem Schlaganfall sowie einer gesteigerten kardiovaskulären Mortalität einhergeht.

Nur sehr wenige dieser Arbeiten haben zusätzlich einen Zusammenhang zwischen den einzelnen Leukozytensubpopulationen und dem kardiovaskulären Risikoprofil untersucht. Für das Differentialblutbild der Leukozyten gilt, dass insbesondere die Anzahl Neutrophiler Granulozyten mit einem Anstieg des kardiovaskulären Risikos verbunden ist. Im Gegensatz dazu zeigen diese Studien für Monozytenzahlen eine geringer gradige Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko (Horne et al., 2005; Grau et al., 2004; Gurm et al., 2003).

Dies erscheint widersprüchlich, da in der Atherogenese Zellen des Monozyten-Makrophagen Systems, nicht jedoch Neutrophile Granulozyten, eine überragende Rolle einnehmen (Binder et al., 2002; Glass and Witztum, 2001). Für die Monozyten gilt, dass bisher lediglich eine Studie (Schlitt et al., 2004) die Monozytenheterogenität in Form der Subpopulationen berücksichtigt hat und Monozytensubpopulationen in den Metaanalysen überhaupt nicht einbezogen wurden.

## 2.4 Monozyten-Makrophagen-System

---

Monozyten stammen von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Nach Ausschwemmung in das periphere Blut stellen sie dort einen Anteil von 3-7% an den Gesamtleukozyten. Nach Diapedese können sich die Monozyten, nun Makrophagen genannt, im ortständigen Gewebe unter anderem zu Kupffer'schen Sternzellen, Osteoklasten, Mikrogliazellen oder anderen dendritischen Zellen differenzieren, welche sich in ihrer Funktion deutlich unterscheiden (Hume, 2006). Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems nehmen eine Schlüsselrolle sowohl bei unspezifischen als auch spezifischen Immunantworten ein. Zu ihrem Aufgabenbereich gehören Antigenpräsentation, Phagozytose und Tumordestruktion (Hume, 2006). Darüber hinaus sezernieren sie eine Vielzahl an Zytokinen (Ziegler-Heitbrock et al., 1992) und sind somit auch bei der Immunregulation von Bedeutung. Sowohl die im Blut zirkulierenden Monozyten als auch die ortständigen Zellen des Makrophagensystems weisen eine beträchtliche Heterogenität auf, welche sich morphologisch, immunhistochemisch, sowie funktionell erfassen lässt.

Anhand des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptors (CD14) identifiziert man klassischerweise Monozyten mit Hilfe von immunologischen Methoden. Die klassischen Monozyten zeigen eine hohe Expression von CD14, jedoch kein CD16; bezeichnet werden diese Zellen als CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> oder vereinfacht als CD16<sup>-</sup> Monozyten. Demgegenüber exprimiert eine kleinere Monozytenpopulation neben CD14 den niedrig affinen Immunglobulin-G Fc- $\gamma$  III Rezeptor (CD16) (Passlick et al., 1989); diese Zellen entsprechen CD16<sup>+</sup> Monozyten, welche wiederum aufgrund der Expressionshöhe des LPS-Rezeptors CD14 in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten differenziert werden.

Morphologisch lassen sich CD16<sup>+</sup> Monozyten von klassischen CD16<sup>-</sup> Monozyten dadurch unterscheiden, dass sie kleiner sind und eine geringere Granularität aufweisen (Passlick et al., 1989). CD16<sup>+</sup> Monozyten weisen im Vergleich zu klassischen CD16<sup>-</sup> Monozyten eine höhere Oberflächenexpression von MHC Klasse II Proteinen auf (Ziegler-Heitbrock et al.,

1993). Sie exprimieren vermindert das antiinflammatorische Zytokin IL-10 nach LPS-Stimulation (Frankenberger et al., 1996). Darüber hinaus produzieren CD14+CD16+ Monozyten nach LPS-Stimulation im Vergleich zu CD14+CD16- Monozyten dreimal soviel TNF (Belge et al., 2002). Deshalb werden CD16+ Monozyten als proinflammatorische Monozyten bezeichnet. Die Expansion der CD16+ Monozytensubpopulation bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Sepsis (Fingerle et al., 1993) und dem Erysipel (Horelt et al., 2002) liefert eine weitere Grundlage für diese Terminologie.

Weiterhin besitzen CD16- und CD16+ Monozyten ein unterschiedliches Repertoire an Zytokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche. So exprimieren CD16+ Monozyten den Fraktalkinrezeptor CX3CR1 in hoher Dichte, welcher bei CD16- Monozyten nahezu nicht vorkommt (Ancuta et al., 2003). In mehreren Studien konnte für Fraktalkin, welches auf Endothelien nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen exprimiert wird, eine besondere Bedeutung in der Atherogenese aufgezeigt werden (Ancuta et al., 2003; Schlitt et al., 2004; Combadiere et al., 2003; Umehara et al., 2004). Eine vermehrte Rekrutierung von CD16+ Monozyten hin zu Fraktalkin exprimierenden Endothelien könnte einen wichtigen Schritt in der Atherogenese darstellen.

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

---

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir aufzeigen, dass Patienten mit koronarangiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu Kontrollpersonen einen höheren Anteil an CD16+ Monozyten aufweisen (Schlitt et al., 2004). Dieser Zusammenhang bleibt auch nach Korrektur für kardiovaskuläre Risikofaktoren bestehen.

Monozyten nehmen allerdings nicht nur im Endstadium im Rahmen der Plaqueruptur eine Schlüsselposition ein, sondern auch in der frühen Atherogenese (Hansson, 2005). Der vermeintliche Widerspruch, dass die Monozytenzahlen allenfalls schwach mit atherosklerotischen Krankheitsbildern assoziiert sind, könnte darauf beruhen, dass

Monozyten bislang nur in ihrer Gesamtheit betrachtet wurden. Hierbei wurde die beträchtliche funktionelle Heterogenität der Monozytensubpopulationen außer Acht gelassen. Aus diesem Grunde wurden folgende Hypothesen aufgestellt.

1. Hypothese

Bei Gesunden ohne manifeste koronare Herzkrankheit korrelieren CD16+ Monozyten mit der Intima-Media-Dicke der Arteriae carotides communes als Marker klinisch inapparenter Atherosklerose.

2. Hypothese

Bei Gesunden ohne manifeste koronare Herzkrankheit korrelieren CD16+ Monozyten mit dem kardiovaskulären Risikoprofil, bestimmt durch die Faktoren Alter, Body-Mass-Index, mittlerer arterieller Blutdruck und Gesamtcholesterin.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg, D
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, D
15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Einmal-Plastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cornig Costar, Wiesbaden, D
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Filterpipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner, Frickenhausen, D
4,7 ml Lithium-Heparin-Gel-, 4,7 ml Serum-Gel-, 5 ml Citrat-, 2,7 ml Kalium-EDTA-Monovetten®	Sarstedt, Nümbrecht, D
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sheath Fluid	Dako Cytomation, Hamburg, D
Parafilm "M"	American National Can, Chicago, USA
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen, D

Tab.01: Verbrauchsmaterialien.

## 3.1.2 Geräte

Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
Eisflockenmaschine (Scotsman)	Tepa, Barsbüttel, D
Eppendorfszentrifuge Minifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Feinwaage Ohaus	Ohaus Corporation, Florham Park, USA
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Einzelhandel, D
Gilson Kolbenhubpipetten	Abimed, Langenfeld, D
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Laborwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen, D
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz, D
Pipetboy plus	Integra Biosciences, Fernwald, D
Minishaker IKA	IKA-Works, Wilmington, USA
Spannungsquelle Consort E452	UniEquip, Martinsried, D
Sterile Werkbank Laminair HB2472	Heraeus Instruments, Hanau, D
Vortex Mixer K	neoLab, Heidelberg, D
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn, D
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

Tab.02: Geräte.

### 3.1.3 Monoklonale Antikörper

<u>Monoklonaler Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Firma</u>
CD14 PerCP	M-Phi-P9	Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD16 APC	3G8	Caltag, Hamburg, D
CD86 PE	HA5.2B7	Coulter Immunotech, Krefeld, D

Tab.03: Monoklonale Antikörper zur Charakterisierung der Monozytenheterogenität.

### 3.1.4 Substanzen

Aqua injectabile	Braun, Melsungen, D
BD FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BSA (Albumine Bovine Fraction IV)	Serva, Heidelberg, D
BSA (nicht acetyliert)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FCS	Seromed, Berlin, D
NaN <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, D
PBS	Biochrom, Berlin, D
PFA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

Tab.04: Substanzen.

### 3.1.5 Puffer und Medien

Das aus Blut von Rinderföten hergestellte fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren im Wasserbad bei 56°C für 30 min erwärmt. Die Herstellung der verwendeten Puffer und Medien ist in Tabelle 04 zusammengefasst.

#### Herstellung der Puffer und Medien

<u>Name</u>	<u>Ingredienz</u>	<u>Menge</u>
<b>FACS-Puffer</b>	BSA	2,5 mg
	NaN <sub>3</sub> 10%	3,5 ml
	PBS	500 ml
	FCS	25 ml
<b>Lysing-Solution</b>	BD-Lysing Solution 10-fach	50 ml
	Aqua dest.	450 ml
<b>NaN<sub>3</sub> 10%</b>	NaN <sub>3</sub>	10 g
	PBS	100 ml
<b>PFA 4%</b>	PFA	8 g
	PBS	200 ml
	Lösen im Wasserbad bei pH-Wert: 7,4-7,6	
<b>PFA 1%</b>	PFA 4%	25 ml
	PBS	75 ml

Tab.05: Herstellung von Puffern und Medien.

## 3.2 Methoden

---

### 3.2.1 Klinischer Teil

#### 3.2.1.1 Studiendesign

Im Rahmen einer Querschnittstudie wurden 622 Probanden rekrutiert. Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um Mitarbeiter des Universitätsklinikum des Saarlandes, welche zu ihrer routinemäßigen Untersuchung in die Betriebsärztliche Dienststelle des Universitätsklinikums des Saarlandes einbestellt wurden. Zusätzlich zu ihrer Terminvereinbarung wurde den in Frage kommenden Personen ein Einladungsschreiben beigelegt, in welchem die Studie vorgestellt und die Möglichkeit zur Teilnahme dargelegt wurde. Folgende Kriterien waren für die Teilnahme an der Studie ausschlaggebend:

#### **Einschlusskriterien:**

- Gesunde Personen im Alter zwischen 30 und 60 Jahren
- Einwilligung nach Aufklärung

#### **Ausschlusskriterien:**

Vorliegen eines/einer

- nicht komplett sanierten Malignoms
- akuten oder chronischen fieberhaften Infektion
- immunsuppressiven Therapie aufgrund einer Autoimmunerkrankung
- manifesten koronaren Herzkrankheit (stattgehabter Herzinfarkt, Koronarintervention oder Aortokoronare Bypass-Operation)

- zerebrovaskuläre Erkrankungen (stattgehabter Apoplex, Carotisoperation oder Carotisintervention)
- peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (stattgehabte nichttraumatische Amputation, stattgehabte Intervention der Becken-Bein-Arterien, stattgehabte periphere Bypass-Operationen)
- Eingeschränkter Nierenfunktion: definiert als  $GFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$

Die Initiierung der Studie, die Rekrutierung der Patienten und die Erhebung der klinischen und immunologischen Daten erfolgte durch das I LIKE HOME Studienteam. Der Verfasser dieser Promotionsarbeit initiierte mit Unterstützung seines Betreuers die I LIKE HOME Studie, rekrutierte die Probanden 1-211 und führte bei ihnen alle klinischen und immunologischen Untersuchungen selbstständig durch.

### 3.2.1.2 Studienablauf

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden wurden bei der routinemäßigen Blutentnahme, welche durch das Pflegepersonal des Blutentnahmediens des der Klinik für Innere Medizin II erfolgte, zusätzlich jeweils eine 4,7 ml Lithium-Heparin-Gel-Monovette® und eine 4,7 ml Serum-Gel-Monovette® mit Vollblut entnommen und bis zur Verarbeitung gekühlt. Darüber hinaus wurden noch 10 ml Urin asserviert.

Im Anschluss an die betriebsärztliche Untersuchung wurden im Gebäude der Klinik für Innere Medizin IV die weiteren Daten erhoben. Auf die Messung der Intima-Media-Dicke (IMT) der Arteriae carotides folgte die Durcharbeitung des Fragebogens und nach vorausgegangener Ruhepause die Messung des Blutdrucks und des Pulses. Nach Bestimmung der klinisch-chemischen Laborwerte durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes erfolgte die Berechnung des Framingham Risk Scores ([www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol)).

Als Evaluation erhielten die Probanden eine Kopie ihres Framingham Risk Score Ergebnisses sowie ein erklärendes, ärztlich verfasstes Begleitschreiben, in welchem zu eventuell pathologischen Ergebnissen der klinisch-chemischen Untersuchungen Stellung bezogen wurde.

### **3.2.1.3 Bestimmung der Intima-Media-Dicke an den Arteriae carotides communes**

Nach del Sol (del Sol et al., 2001) ist die IMT der Arteriae carotides communes (ACC) wie folgt definiert:

1. Im longitudinalen B-Mode-Bild der Arteriae carotides communes stellen sich die Vorder- und Hinterwand als charakteristische, echoreiche Doppelreflexe dar. Vorder- und Hinterwand werden durch das echofreie Gefäßlumen voneinander abgegrenzt werden.
2. Der Doppelreflex setzt sich aus folgenden drei Anteilen zusammen: Einem lumennahen, schmalen, echoreichen Reflexband, getrennt durch einen echoarmen Saum von einem abluminal gelegenen, echoreichen, breiten Reflexband.
3. Der Abstand zwischen der adluminal gelegenen Kante des schmalen Reflexbandes und der in Richtung Gefäßlichtung zeigenden Kante des breiten Reflexbandes stellt den Intima-Media-Komplex dar.

Die Messung der Intima-Media-Dicke (IMT) der Arteriae carotides communes erfolgte sonographisch an der Hinterwand der ACC. Hierzu wurde ein Siemens Sonoline Sienna Ultraschallgerät (München, Deutschland) verwendet, welches mit einem geeigneten 7,5 MHz Linear-Schallkopf ausgerüstet war. Zunächst stellten Erstuntersucher - während des gesamten Studienzeitraumes insgesamt zwei Erstuntersucher - die IMT der ACC beidseits, nach unten aufgeführtem Protokoll dar und speicherten dieses Bild auf einem Datenträger.

### **Studienprotokoll zur Darstellung und Messung der Intima-Media-Dicke**

Das Aufsuchen der A. carotis communis erfolgte zunächst im Querschnitt. Die Abgrenzung zu der V. jugularis interna geschah anhand folgender Kriterien:

1. Fehlende vollständige Komprimierbarkeit der Arterie durch über den Schallkopf ausgeführten Druck
2. Pulsationsphänomene der Arterie
3. Aufsuchen des charakteristischen Bulbus Arteriae carotis - hierzu wurde der Schallkopf im Querschnittsbild nach kranial bewegt, bis sich ein deutliches

Auseinanderweichen der Vorder- und der Hinterwand bzw. zwei diskrete Lumina sichtbar waren.

Nach Identifikation des Bulbus in der Querschnittseinstellung erfolgte eine Drehung der Sonde um 90° in den Längsschnitt. Der Anfang (dem proximalen Abschnitt entsprechend) des Bulbus wurde im Longitudinalbild als die Stelle der beginnenden Lumenerweiterung der A. carotis communis mit anschließender Auftrennung in zwei Gefäße definiert.

Bestimmt wurde die IMT anhand der „Optimaleinstellung“ im Longitudinalbild der ACC, welche folgendermaßen charakterisiert war:

Im Längsbild musste der IMT-Komplex der Gefäßhinterwand kontinuierlich über einen Abstand von 30 mm proximal des Bulbus als charakteristischer Doppelreflex sichtbar sein und sich an den prädefinierten Messpunkten darstellen. Der Beginn des Bulbus diente als Nullpunkt. An den Messpunkten 10, 20 und 30 mm proximal des Bulbus wurde die IMT an plaquefreien Abschnitten im Standbild gemessen. Aus insgesamt sechs IMT-Messwerten (je drei Werte links und rechts) wurde ein IMT-Mittelwert errechnet, welcher für die statistische Auswertung verwendet wurde. Als Plaque definiert wurde eine umschriebene IMT-Verdickung  $\geq 11$  mm, unabhängig vom Vorhandensein eines Schallschattens.

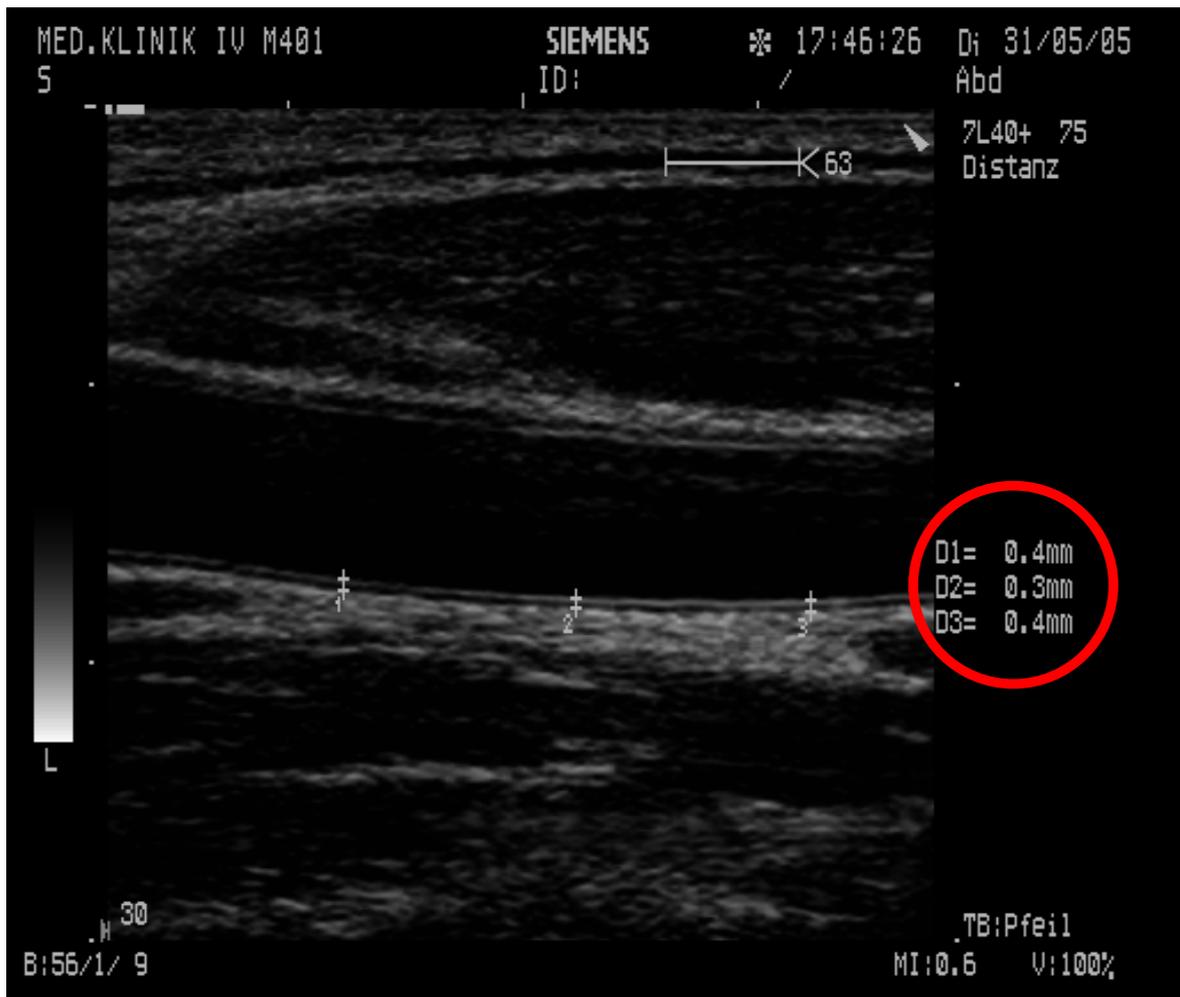


Abb.01: Messung der Intima-Media-Dicke.

Durch Verwendung desselben Gerätes und die geblindete IMT-Messung durch denselben Untersucher während des gesamten Studienzeitraums, sollten geräte- und untersucherabhängige Messvariationen minimiert werden.

### 3.2.1.4 Durchführung des Fragebogens

Mit den Probanden wurde eine standardisierte Kurzanamnese in Form eines Fragebogens (vgl. unter 9.3) zur Abklärung von Risikofaktoren und von Ein- sowie Ausschlusskriterien durchgeführt. Der hierbei verwendete Fragebogen basierte auf einer deutschen Übersetzung des Fragebogens der WHO zur Erkennung von Angina pectoris und einer peripheren arteriellen Verschlusskrankung. Mittels zusätzlicher Fragen wurde das Vorliegen oben genannter Ein- und Ausschlusskriterien überprüft, der Nikotin- und Alkoholkonsum quantifiziert und eine etwaige familiäre Belastung mit kardiovaskulären Erkrankungen

(Herzinfarkt oder Schlaganfall bei einem Elternteil oder einem Geschwister vor dem 60. Lebensjahr) überprüft.

### **3.2.1.5 Blutdruckmessung**

In Anschluss an die Messung der Intima-Media-Dicke und Erhebung der Kurzanamnese erfolgte nach mindestens fünfminütiger Ruhepause die Blutdruckmessung. Die Messung erfolgte als indirekte Blutdruckmessung nach Riva-Rocci durch Auskultation der Korotkow-Töne in der Fossa cubitalis zur Ermittlung des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Hierbei wurde immer dasselbe Blutdruckmessgerät verwendet, um mögliche geräteabhängige Messfehler auszuschließen.

### **3.2.1.6 Labordiagnostik**

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes wurden Kreatinin im Serum, Differentialblutbild, CRP, Gesamtcholesterin, Triglyceride, LDL- und HDL-Cholesterin Urinstix, Urin-Albumin, Uringesamtprotein, und Urin-Kreatinin nach Standardmethoden bestimmt. Die Errechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) erfolgte anhand der MDRD-Formel durch das Zentrallabor (<http://www.kidney.org/professionals/KDOQI>).

### **3.2.1.7 Framingham Risk Score**

Die Bestimmung des kardiovaskulären Risikos erfolgte mittels des Framingham Risk Calculators, der vom „National Cholesterol Education Programme“ (NCEP) im Internet bereitgestellt wird ([www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol)). Der Risk Calculator errechnet aus den Variablen Blutdruck, Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und Einnahme blutdrucksenkender Medikamente das prozentuale Risiko, innerhalb der nächsten zehn Jahre einen nicht-tödlichen Myokardinfarkt oder einen koronarvaskulären Todesfall zu erleiden. Hierbei werden Personen, die im letzten Monat mindestens eine Zigarette rauchten, als Raucher kategorisiert.

Der niedrigste erreichbare Wert beträgt <1%, der höchste Wert >20%. Entsprechend der berechneten Prozente erfolgt eine Einteilung in drei Kategorien.

1. Hohes koronares Risiko: errechnetes Risiko >20% oder eines der aufgeführten KHK-Äquivalente
  - Diabetes mellitus
  - periphere arterielle Verschlusskrankheit
  - Aneurysma der Aorta abdominalis
  - mindestens 50%ige Arteria carotis Stenose
  - stattgehabte transitorische ischämische Attacke, Schlaganfall oder Myokardinfarkt
  - sonstige atherosklerotische Erkrankungen (zum Beispiel Nierenarterienstenose)
2. Intermediäres koronares Risiko: 10-20%
3. Niedriges koronares Risiko: <10%

### **3.2.2 Immunologisch-experimenteller Teil**

#### **3.2.2.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen**

Für die Färbungen wurden die gewonnenen Blutproben direkt nach der Blutentnahme auf Eis gekühlt und innerhalb von vier Stunden weiterverarbeitet.

Zellen des peripheren Blutes lassen sich anhand ihrer jeweils spezifischen antigenen Eigenschaften nach dem Prinzip der Immunphänotypisierung differenzieren. Die jeweiligen Zelloberflächenantigene werden mittels der Cluster of Differentiation (CD) in einer internationalen Nomenklatur erfasst. Die Phänotypisierung erfolgt mit Hilfe Fluorchrom-konjugierter monoklonaler Antikörper, welche bei der durchflusszytometrischen Messung detektiert werden.

Klassischerweise wird die Monozytenheterogenität mit Hilfe von Antikörpern gegen CD14 und CD16 erfasst. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich CD86 als panmonozytärer Marker verwendet. Bei dem angewendeten Färbeprotokoll handelt es sich um eine Methode, welche im immunologischen Labor der Klinik für Innere Medizin IV als Standardmethode etabliert ist.

Aus jeder Blutprobe wurden je 70 µl Li-heparinisertes Vollblut in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Das Blut wurde mit 2 ml FACS-Puffer suspendiert, mittels Vortex gemischt und anschließend 7 min lang mit 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet mit 51 µl FACS-Puffer re-suspendiert.

Daraufhin wurden 4 µl anti-CD86, 4 µl anti-CD14 und 1 µl anti-CD16 dazu pipettiert. Nach Mischen mit dem Vortex wurde die Probe bei 4 °C im Kühlschrank im Dunkeln 30 min lang inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Probe 1 ml 1fach BD-Lysing Solution hinzugesetzt und anschließend gevortext. Bei diesem Schritt wurden die Erythrozyten lysiert. Während des 12-minütigen Lyse-Vorganges wurde die Probe bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Anschließend wurden nochmals zwei Waschvorgänge durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit FACS-Puffer versetzt, so dass schließlich ca. 2 ml Volumen im FACS-Röhrchen vorhanden waren; das heißt beim ersten Waschvorgang wurden 1 ml und beim zweiten Waschvorgang wurden 2 ml FACS-Puffer hinzugefügt. Nach „Vortexen“ und anschließendem Zentrifugieren bei 1300 U/min für 7 min wurde der Überstand jeweils abgesaugt. Schließlich wurde das Pellet in 200 µl 1%igem PFA fixiert und nach „Vortexen“ bei 4 °C im Kühlschrank bis zur FACS-Messung gelagert.

**Vollblutfärbung - Monozytenheterogenität**

<u>Antikörper</u>	<u>Menge</u>
CD86 PE	4,0 µl
CD14 PerCP	4,0 µl
CD16 APC	0,5 µl
FACS-Puffer	51,5 µl

Tab.06: Pippetierschema.

### 3.2.2.2 Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse

Die Proben wurden noch am Tag ihrer Gewinnung und Verarbeitung mittels eines Durchflusszytometers (FACS Calibur, Becton Dickinson) analysiert.

Monozyten wurden anhand ihrer Expression von CD86 sowie ihrer Lage im Vorwärts-/Seitwärts-Scatter definiert. Das Gating wurde von einem einzigen Untersucher durchgeführt; hierbei konnte zwischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten differenziert werden (Abb.02).

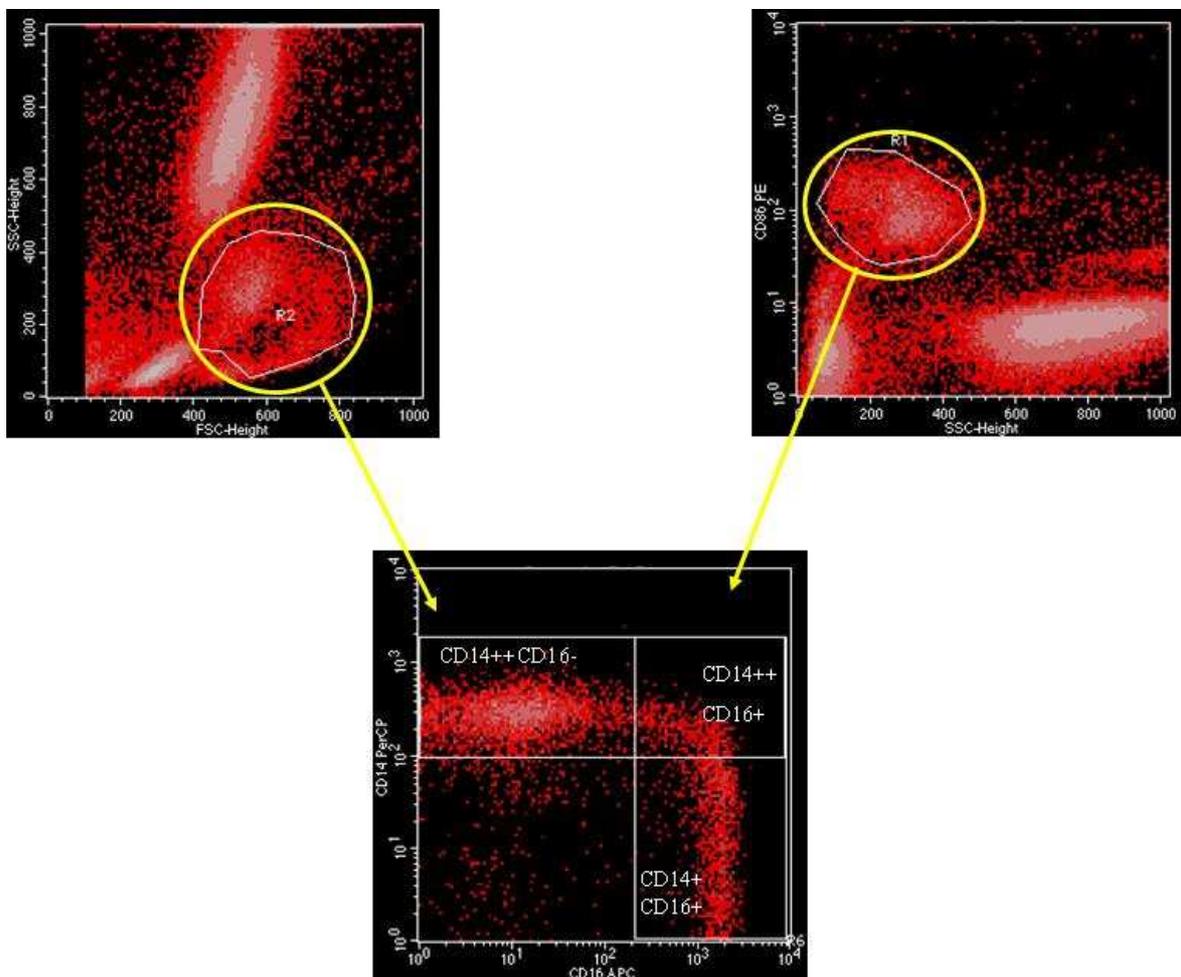


Abb.02: Gatingstrategie: Monozyten wurden anhand ihrer spezifischen Lage im forward/sideward scatter und zusätzlich über ein CD86/sideward scatter-gate identifiziert.

### 3.3 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Folgende PC-Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

<u>PC-Programme</u>	<u>Anwendung</u>
Microsoft Word	Textverarbeitung
Microsoft Excel	Datenverarbeitung
Microsoft Access	Datenverwaltung
Microsoft Power Point	Tabellen und Abbildungen
SPSS 13.0	Statistik und Graphik
CellQuest Pro	Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Tab.07: Software.

Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; kategoriale Variablen wurden als prozentuale Anteile der jeweiligen Gesamtpopulation aufgeführt.

Kontinuierliche Variablen wurden mittels Mann-Whitney-Test (Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen) verglichen.

Zur Untersuchung von Korrelationen zwischen zwei kontinuierlichen Variablen wurde der Korrelationskoeffizienten nach Spearman errechnet. Ferner wurden die Probanden anhand der CD16+ Zellzahlen in Quintile stratifiziert, um Zusammenhänge zwischen ansteigenden CD16+ Monozytenzahlen und der Intima-Media-Dicke näher darzustellen.

Unabhängige Zusammenhänge zwischen subklinischer Atherosklerose als abhängige Variable und kardiovaskulären Risikofaktoren sowie Monozytensubpopulationen als unabhängige Variablen wurden durch Berechnung eines linearen Regressionsmodellen erfasst. Das Signifikanzniveau wurde in allen Tests mit 5% festgesetzt. Die Datenverarbeitung und die statistische Auswertung erfolgte mit SSPS 13.0 (SSPS Inc., USA).

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 Charakteristika des Studienkollektivs

---

#### 4.1.1 Kardiovaskuläres Risikoprofil

Insgesamt konnten 622 Freiwillige für die Studienteilnahme gewonnen werden. In die immunologische Auswertung flossen die Datensätze von 584 Teilnehmern ein, da bei 28 Probanden die Immunphänotypisierung der Monozyten fehlschlug, bei drei Personen keine IMT bestimmt wurde und sieben Teilnehmer eines der oder mehrere der Ausschlusskriterien aufwiesen.

Von den 584 Personen waren 63,4% Frauen (N=370), 30,8% wurden als aktive Raucher klassifiziert (N=180), 17,4% hatten eine positive Familienanamnese für ein kardiovaskuläres Ereignis vor dem 60. Lebensjahr (N=102) und 2,6% waren Diabetiker (N=15). Weitere Parameter der 584 Personen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
Alter (Jahre)	42	8	25	60
Gewicht (kg)	74	15	47	165
Größe (cm)	170	9	146	202
Body-Mass-Index (kg/m <sup>2</sup> )	25	4	17	58
Systolischer Blutdruck (mmHg)	131	18	90	215
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	85	10	55	124
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	100	12	70	152
Sportliche Betätigung (Einheiten <sup>*</sup> /Woche)	1,5	1,8	0	7
Alkoholkonsum (Gläser <sup>#</sup> /Woche)	3,0	4,5	0	56
Serumkreatinin (mg/dl)	0,9	0,2	0,5	2,4
Leukozyten/ $\mu$ l	6763	1881	2800	16400
Gesamtcholesterin (mg/dl)	198	37	100	320
HDL-Cholesterin (mg/dl)	67	17	28	135

Tab.08: Charakteristika des Studienkollektivs (N=584).

\*Sportliche Betätigung über >30 min und in einer Intensität, welche zum Schwitzen führt.

#Ein Glas Alkohol = 350 ml Bier, 120 ml Wein oder 45 ml Spirituosen.

## 4.1.2 Intima-Media-Dicke in der I LIKE HOME Studie

### 4.1.2.1 Häufigkeitsdarstellung der IMT-Mittelwerte in der Gesamtpopulation

Die errechneten IMT-Mittelwerte wurden in Intervalle eingeteilt, wobei Intervall I Werte  $<0,30$  mm einschloss, Intervall II von  $0,31$  mm bis  $0,40$  mm; Intervall III von  $0,41$  mm bis  $0,50$  mm; Intervall IV von  $0,51$  mm bis  $0,60$  mm reichte und das Intervall V Werte  $>0,61$  mm einbezog. Betrachtete man die Häufigkeitsverteilung der IMT-Mittelwerte auf die Intervalle, so zeigte sich eine erhebliche Ungleichverteilung. Das Intervall von  $0,31$  mm bis  $0,50$  mm umfasste mehr als 84% der errechneten IMT-Mittelwerte.

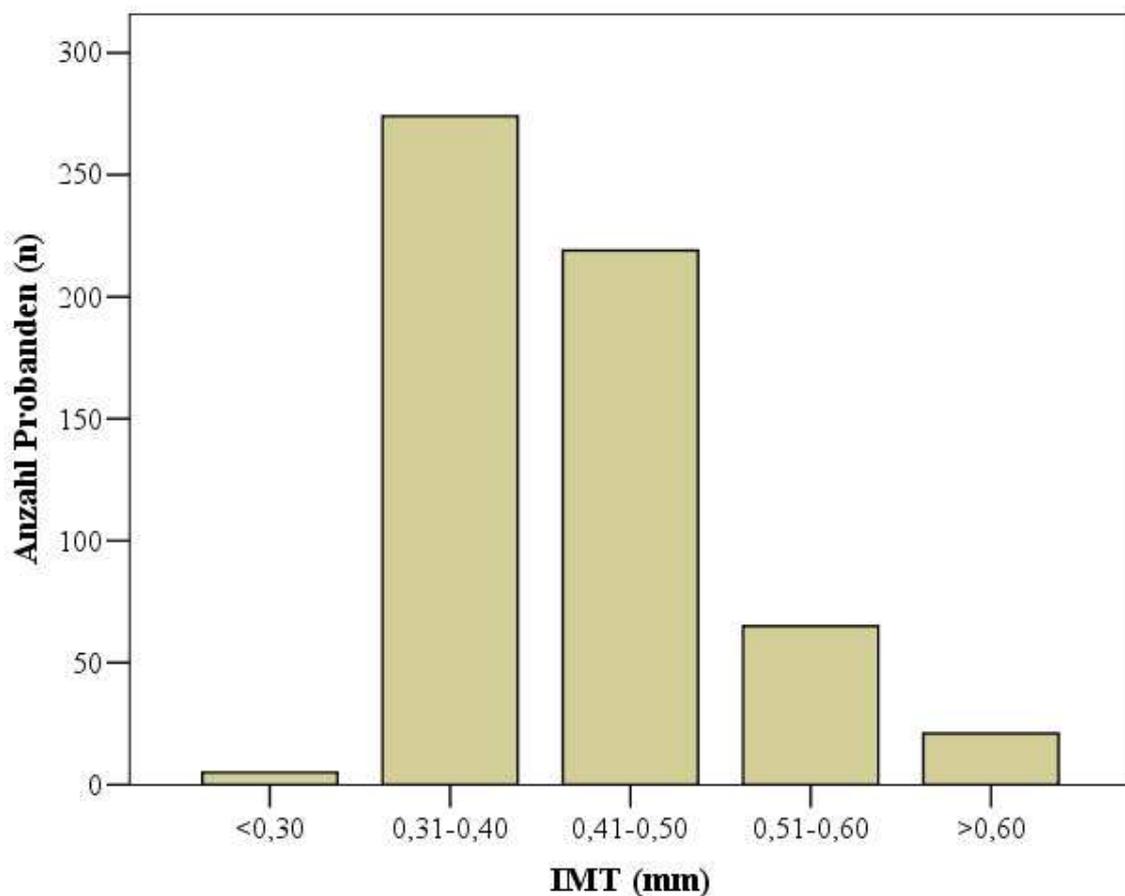


Abb.03: Häufigkeitsverteilung der mittleren Intima-Media-Dicke.

#### **4.1.2.2 IMT-Mittelwerte und Subgruppen**

Im Vergleich zu Frauen hatten Männer eine statistisch signifikant höhere IMT ( $0,42 \pm 0,07$  mm vs  $0,45 \pm 0,09$  mm;  $p < 0,001$ ). Zusätzlich unterschied sich die IMT signifikant zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern ( $0,48 \pm 0,09$  mm vs  $0,43 \pm 0,08$  mm;  $p = 0,012$ ), nicht jedoch zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern.

#### **4.1.2.3 Korrelation der Intima-Media-Dicke mit kardiovaskulären Risikofaktoren**

Die Intima-Media-Dicke korrelierte gut mit den traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren Alter ( $r = 0,504$ ;  $p < 0,001$ ), Body-Mass-Index ( $r = 0,352$ ;  $p < 0,001$ ), mittlerer Blutdruck ( $r = 0,397$ ;  $p < 0,001$ ) Gesamtcholesterin ( $r = 0,189$ ;  $p < 0,001$ ) und HDL-Cholesterin ( $r = -0,207$ ;  $p < 0,001$ ).

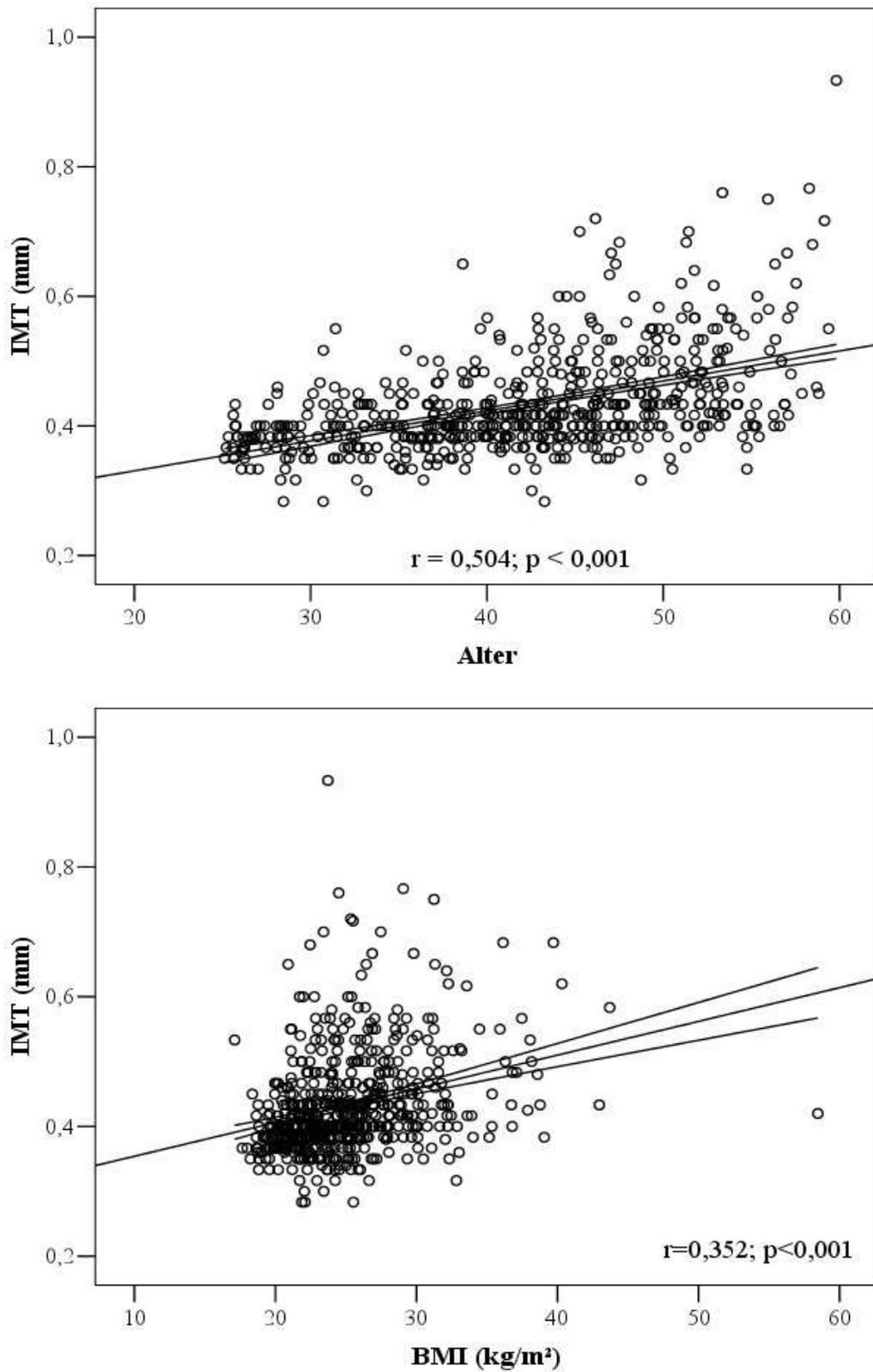


Abb.04: Korrelation der Intima-Media-Dicke mit dem Alter bzw. BMI.

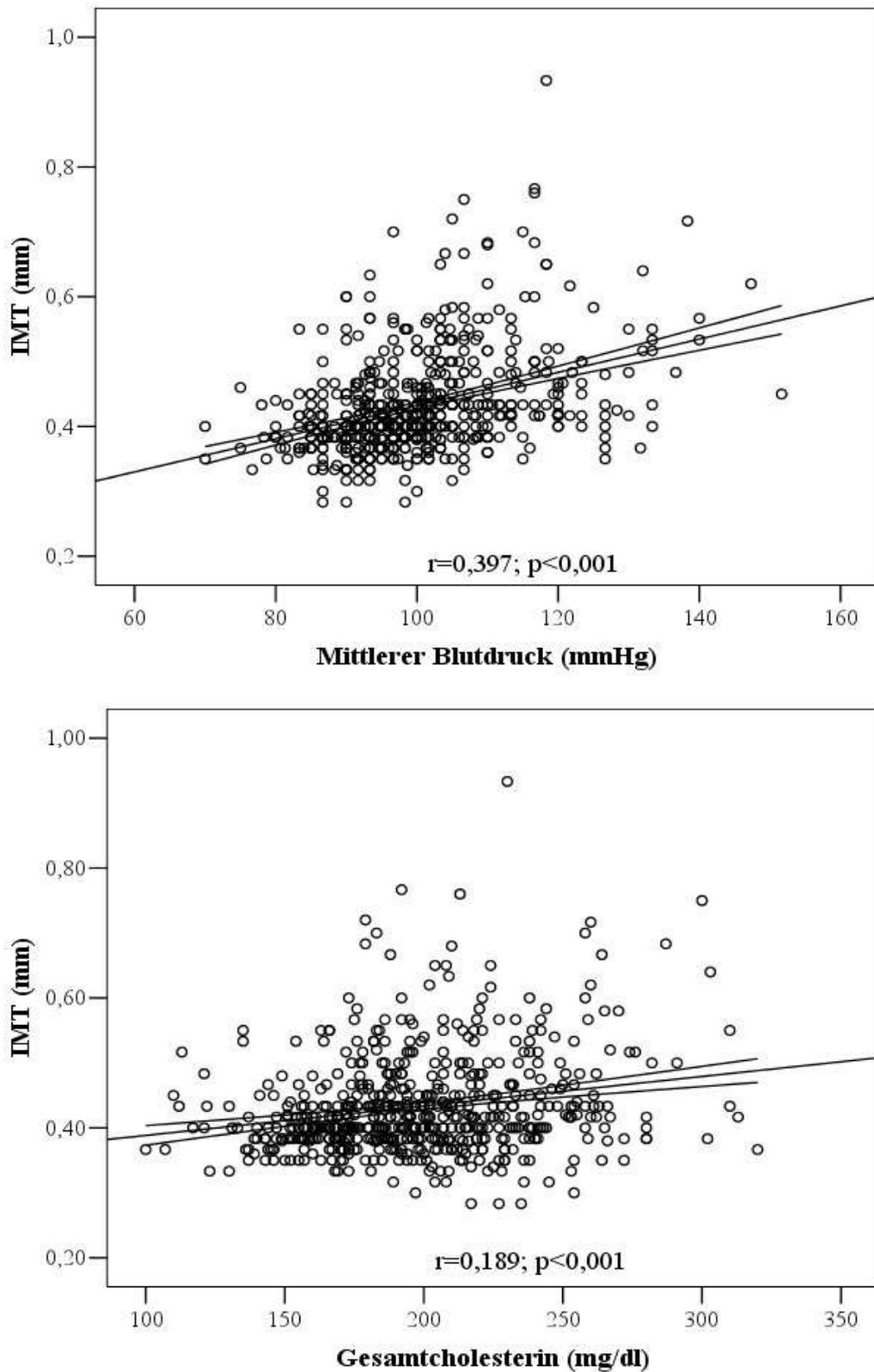


Abb.05: Korrelation der IMT mit dem mittleren Blutdruck, respektive dem Gesamtcholesterin.

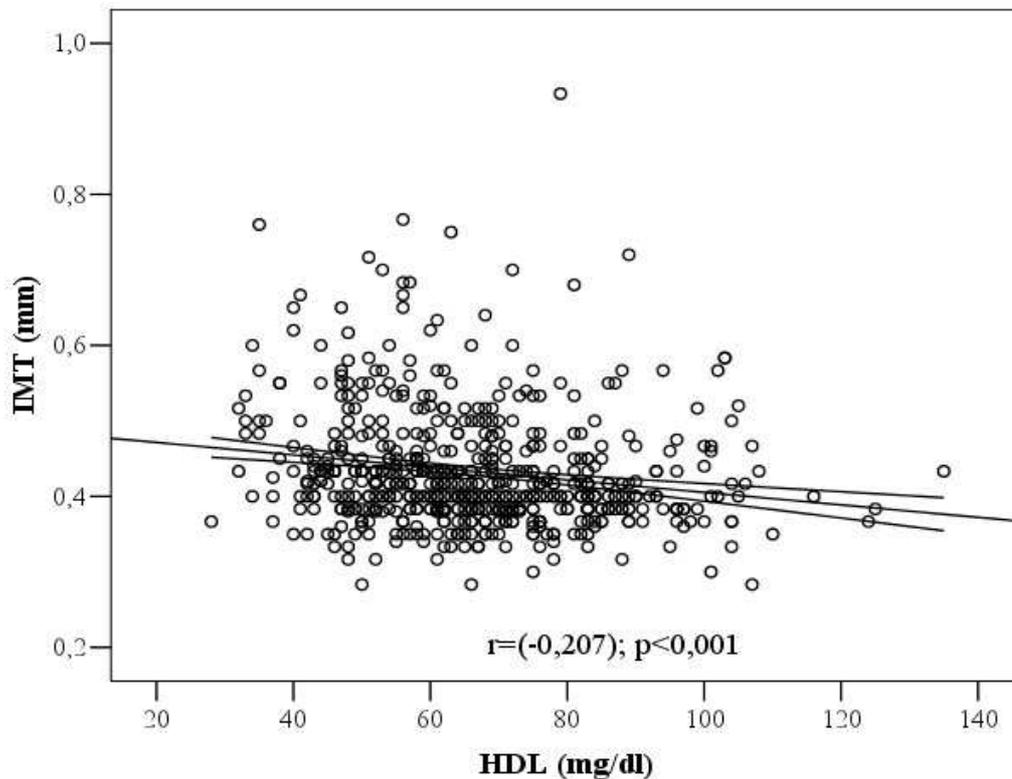


Abb.06: Inverse Korrelation der IMT mit dem HDL-Cholesterin.

#### 4.1.2.4 Gesamtleukozyten und Monozyten in der I LIKE HOME Studie

Die Studienteilnehmer wiesen im Mittel  $6763 \pm 1881$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  und  $486 \pm 168$  Monozyten/ $\mu\text{l}$  ( $7,3 \pm 1,9\%$  aller Leukozyten) auf. Von den Gesamtmonozyten waren  $405 \pm 146$  Zellen ( $83,0 \pm 6,4\%$  aller Monozyten) CD16- Monozyten, und  $81 \pm 42$  Zellen waren CD16+ Monozyten ( $17,0 \pm 6,4\%$  aller Monozyten). Innerhalb der Subpopulation CD16+ Monozyten waren  $20 \pm 13$  Zellen ( $4,1 \pm 1,7\%$  aller Monozyten) CD14++CD16+ Zellen und  $61 \pm 33$  Zellen ( $12,9 \pm 5,7\%$  aller Monozyten) waren CD14+CD16+ Zellen.

---

## 4.2 Zusammenhang zwischen Leukozyten, Monozyten, Monozytenheterogenität und kardiovaskulären Risikofaktoren

---

### 4.2.1 Gesamtleukozyten, Neutrophile, Gesamtmonozyten, CD16- Monozyten und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Gesamtleukozytenzahlen [GZ] und Neutrophilenzahlen [NZ] waren statistisch signifikant assoziiert mit dem Alter (GZ:  $r=0,106$ ;  $p=0,010$ ; NZ:  $r=0,105$ ;  $p=0,011$ ), Body-Mass-Index (GZ:  $r=0,125$ ;  $p=0,002$ ; NZ:  $r=0,092$ ;  $p=0,026$ ) und dem mittleren Blutdruck (GZ:  $r=0,103$ ;  $p=0,012$ ; NZ:  $r=0,095$ ;  $p=0,022$ ). Keine Korrelation bestand zwischen diesen Zellen und dem Gesamtcholesterin sowie dem HDL-Cholesterin. Bei Betrachtung der Monozyten zeigte sich, dass weder Gesamtmonozyten, noch CD16- Monozyten signifikant mit einem der aufgeführten Risikofaktoren korrelierten. Weiterhin bestand kein geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen den Gesamtmonozytenzahlen und Diabetiker unterschieden sich nicht von Nicht-Diabetikern in ihren Gesamtmonozytenzahlen.

Die einzelnen Korrelationskoeffizienten sind nochmals in Tabelle 09 zusammengefasst.

### 4.2.2 CD16+ Monozyten und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Allerdings stellte sich heraus, dass CD16+ Monozyten mit dem Alter ( $r=0,125$ ;  $p=0,003$ ), dem BMI ( $r=0,220$ ;  $p<0,001$ ), dem mittleren Blutdruck ( $r=0,182$ ;  $p<0,001$ ), und invers mit dem HDL-Cholesterin ( $r=-0,100$ ;  $p=0,016$ ) signifikant in Zusammenhang standen. Um eine etwaige biologische Bedeutung der Unterscheidung zwischen den beiden CD16+ Monozytensubpopulationen zu erfassen, wurden CD14++CD16+ Monozyten und CD14+CD16+ Monozyten in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren getrennt analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Assoziation von CD16+ Monozyten mit den oben genannten kardiovaskulären Risikofaktoren hauptsächlich durch eine Korrelationen von CD14+CD16+ Monozyten mit dem Alter ( $r=0,151$ ;  $p<0,001$ ), dem BMI ( $r=0,252$ ;  $p<0,001$ ), dem mittleren Blutdruck ( $r=0,204$ ;  $p<0,001$ ), dem Gesamtcholesterin ( $r=0,084$ ;

p=0,044) und invers mit dem HDL-Cholesterin ( $r=-0,096$ ;  $p=0,020$ ) bedingt war; CD14++CD16+ Monozyten hingegen waren lediglich mit dem diastolischen Blutdruck ( $r=0,100$ ;  $p=0,016$ ) signifikant assoziiert.

#### **4.2.3 Gesamtleukozyten, Gesamtmonozyten, CD16- Monozyten, CD16+ Monozyten und Rauchen**

Raucher [R] unterschieden sich von Nicht-Rauchern [N-R] in der Anzahl der Gesamtleukozyten (R:  $7679\pm 2030$  Zellen/ $\mu$ l; N-R:  $6355\pm 1657$  Zellen/ $\mu$ l;  $p<0,001$ ) der Gesamtmonozyten (R:  $555\pm 182$  Zellen/ $\mu$ l; N-R:  $456\pm 152$  Zellen/ $\mu$ l;  $p<0,001$ ) und der CD16- Monozyten (R:  $475\pm 159$  Zellen/ $\mu$ l; N-R:  $374\pm 129$  Zellen/ $\mu$ l;  $p<0,001$ ). In der Population der CD16+ Monozyten fiel auf, dass CD14++CD16+ Zahlen bei Rauchern höher (R:  $23\pm 15$  Zellen/ $\mu$ l, N-R:  $19\pm 12$  Zellen/ $\mu$ l;  $p=0,024$ ), und CD14+CD16+ Monozytenzahlen niedriger (R:  $58\pm 34$  Zellen/ $\mu$ l; N-R:  $62\pm 33$  Zellen/ $\mu$ l;  $p=0,012$ ) als bei Nicht-Rauchern waren.

#### **4.3 Gesamtleukozyten, Neutrophile, Gesamtmonozyten und Intima-Media-Dicke**

---

Beobachtet werden konnte eine schwache Korrelation zwischen Gesamtleukozyten ( $r=0,081$ ;  $p=0,049$ ) mit der Intima-Media-Dicke als Marker subklinischer Atherosklerose. Bei Analyse der Gesamtmonozytenzahlen ( $r=0,056$ ;  $p=0,175$ ) und der Neutrophilen ( $r=0,060$ ;  $p=0,149$ ) zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit der IMT.

---

#### 4.4 Intima-Media-Dicke und CD16+ Monozyten: CD14++CD16+ und CD14+CD16+ Monozyten

---

Bei Betrachtung von Intima-Media-Dicke und Monozytenheterogenität zeigte sich eine signifikante subpopulationsspezifische Assoziation von CD16+ Monozyten mit der Intima-Media-Dicke ( $r=0,137$ ;  $p=0,001$ ). CD16- Monozyten hingegen waren nicht mit subklinischer Atherosklerose korreliert ( $r=0,028$ ;  $p=0,504$ ). Unter Berücksichtigung der beiden CD16+ Monozytensubpopulationen (CD14++CD16+ und CD14+CD16+) stellte sich heraus, dass lediglich die CD14+CD16+ Monozyten ( $r=0,144$ ;  $p<0,001$ ), jedoch nicht die CD14++CD16+ Monozyten ( $r=0,054$ ;  $p=0,191$ ) mit der Intima-Media-Dicke korrelierten.

Nach Stratifizierung der Probanden anhand der CD16+ Zellzahlen in Quintile sah man eine stetige Zunahme der mittleren Intima-Media-Dicke von der zweiten bis zur fünften Quintile. Analog zu den kardiovaskulären Risikofaktoren sah man, dass CD14+CD16+ Monozyten für diesen Umstand verantwortlich waren. Nach Einteilung der CD14+CD16+ Monozyten in Quintile zeigte sich eine signifikante Zunahme der mittleren IMT über die Quintile zwei bis fünf (vgl. Abb.07). Zwischen der IMT und steigender Gesamtmonozytenzahlen bzw. CD16- Monozytenzahlen oder CD14++CD16+ Monozytenzahlen bestand kein Zusammenhang.

Um die Bedeutung CD16+ Monozyten als eigenständiger Prädiktor subklinischer Atherosklerose zu analysieren, wurde ein Multiregressionsmodell entworfen, welches folgende Parameter umfasste: Anzahl CD16+ Monozyten, Geschlecht, Alter, Gesamtcholesterin, Vorhandensein von Diabetes mellitus, mittlerer Blutdruck und Body-Mass-Index. Hier zeigte sich, dass lediglich männliches Geschlecht, höherer Blutdruck und höheres Alter unabhängige Prädiktoren subklinischer Atherosklerose waren.

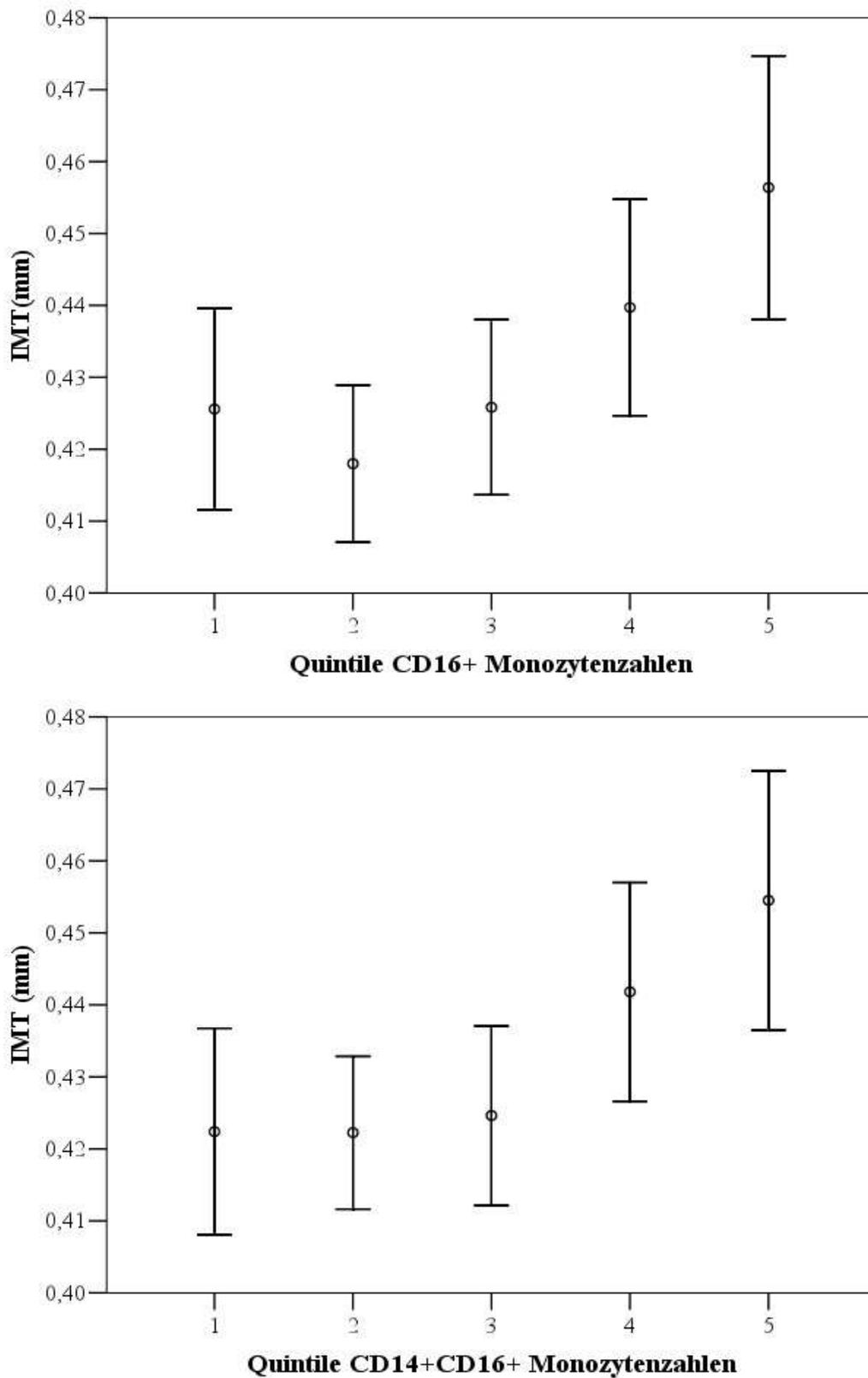


Abb.07: Darstellung der Intima-Media-Dicke in Abhängigkeit steigender CD16+, bzw. CD14+CD16+ Monozytenzahlen eingeteilt in Quintile.

Tab.09: Korrelationen zwischen Gesamtleukozytenzahlen, Leukozytensubpopulationen, Monozytensubpopulationen mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren; signifikante Korrelationen sind fett gedruckt.

	Leukozyten		Neutrophile		Lymphozyten		Monozyten		CD16 <sup>-</sup> Monozyten		CD16 <sup>+</sup> Monozyten		CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten		CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
<b>Alter</b>	0,106	<b>0,010</b>	0,105	<b>0,011</b>	0,075	0,069	0,039	0,349	0,013	0,745	0,125	<b>0,003</b>	0,010	0,812	0,151	<b>&lt;0,001</b>
<b>BMI</b>	0,125	<b>0,002</b>	0,092	<b>0,026</b>	0,130	<b>0,002</b>	0,051	0,219	0,003	0,944	0,220	<b>&lt;0,001</b>	0,061	0,139	0,252	<b>&lt;0,001</b>
<b>Systolischer RR</b>	0,090	<b>0,029</b>	0,087	<b>0,035</b>	0,049	0,234	0,032	0,434	0,001	0,988	0,144	<b>0,001</b>	0,001	0,989	0,176	<b>&lt;0,001</b>
<b>Diastolischer RR</b>	0,108	<b>0,009</b>	0,094	<b>0,023</b>	0,055	0,184	0,082	<b>0,047</b>	0,042	0,308	0,188	<b>&lt;0,001</b>	0,100	<b>0,016</b>	0,198	<b>&lt;0,001</b>
<b>Mittlerer RR</b>	0,103	<b>0,012</b>	0,095	<b>0,022</b>	0,054	0,193	0,064	0,121	0,024	0,562	0,182	<b>&lt;0,001</b>	0,058	0,165	0,204	<b>&lt;0,001</b>
<b>Gesamtcholesterin</b>	0,035	0,405	-0,019	0,654	0,141	0,001	-0,014	0,735	-0,028	0,494	0,059	0,158	-0,026	0,532	0,084	<b>0,044</b>
<b>HDL-Cholesterin</b>	-0,078	0,061	-0,064	0,123	-0,077	0,063	-0,064	0,120	-0,044	0,287	-0,100	<b>0,016</b>	-0,071	0,088	-0,096	<b>0,020</b>

Tab.10: Multiregressionanalyse mit der IMT als abhängiger Variable.

	Modell	Regressionskoeffizient	Konfidenzintervall	Signifikanzniveau
abhängige Variable: IMT (mm)				
Konstante	0,134		0,081 - 0,187	<0,001
Geschlecht (weiblich)	-0,024		(-0,036) - (-0,013)	<0,001
CD14+CD16+ Zellen (pro µl)	4,13E-005		0,000 - 0,000	0,535
Gesamtcholesterin	5,25E-005		0,000 - 0,000	0,510
Mittlerer Blutdruck (mmHg)	0,000		0,001 - 0,002	0,000
Body-Mass-Index (kg/m <sup>2</sup> )	0,001		0,000 - 0,002	0,152
Alter (Jahren)	0,000		0,003 - 0,005	0,000
Diabetes mellitus (Ja)	0,018		(-0,039) - 0,031	0,819

## 5 DISKUSSION

---

### 5.1 Bedeutung von Monozyten in der Atherosklerose

---

Monozyten und Makrophagen spielen in der Atherosklerose eine herausragende Rolle. Schon die erste morphologisch erfassbare Veränderung, der „Fatty Streak“, ist durch ein von Monozyten/Makrophagen dominiertes zelluläres Infiltrat charakterisiert. Im Verlauf der Erkrankung, vom Wachstum des atherosklerotischen Plaques bis hin zur Plaqueruptur, zu der aktivierte Monozyten/Makrophagen beitragen, haben Monozyten/Makrophagen eine Schlüsselstellung inne (Binder et al., 2002; Getz, 2005; Glass and Witztum, 2001). Beim Menschen ist die pathophysiologische Bedeutung von Monozyten in der Atherosklerose schon seit langem gesichert. Darüber hinaus wurde kürzlich mit Hilfe von Tierexperimenten in vivo dargelegt, dass Monozyten während des gesamten zeitlichen Verlaufes in die wachsenden atherosklerotischen Läsionen einwandern (Nahrendorf et al., 2008; Swirski et al., 2006) und zum Beginn, sowie dem Fortschreiten der Erkrankung beitragen.

Obwohl die pathophysiologische Bedeutung von Monozyten in der Atherosklerose zweifelsohne feststeht, ist es bislang keiner großen epidemiologischen Studie überzeugend gelungen, eine Assoziation zirkulierender Monozytenzahlen und Markern der Atherosklerose, etwa der Intima-Media-Dicke, aufzuzeigen (Chapman et al., 2004; Johnsen et al., 2005). Vielmehr erscheinen bei Analyse zirkulierender Leukozytensubpopulationen die Neutrophilen Granulozyten als bessere Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zu Monozytenzahlen (Grau et al., 2004; Gurm et al., 2003; Horne et al., 2005), obgleich die Bedeutung der Neutrophilen Granulozyten in der Atherosklerose bestenfalls zweifelhaft ist (Binder et al., 2002; Glass and Witztum, 2001). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die 1989 erstbeschriebene Monozytenheterogenität bei epidemiologischen Arbeiten zur Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse bislang weitgehend unberücksichtigt blieb (Passlick et al., 1989).

---

## 5.2 Biologie CD16+ Monozyten

---

Passlick et al. wiesen 1989 nach, dass die Mehrzahl zirkulierender Monozyten den LPS-Rezeptor CD14, jedoch nicht den FC $\gamma$ III-Rezeptor CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit definitionsgemäß CD16- Monozyten darstellen (Passlick et al., 1989). Im Gegensatz dazu wird die CD16+ Monozytensubpopulation aus einem Pool von ca. 10-20% aller Monozyten gebildet, welche sowohl CD14, als auch CD16 auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. In den folgenden Jahren stützte sich die weitere Erforschung der Monozytenheterogenität zunächst auf in vitro Experimente mit humanen Monozyten und Beobachtungsstudien beim Menschen.

Man erkannte, dass CD16+ Monozyten nach Stimulation mit LPS vermehrt proinflammatorische Zytokine, TNF- $\alpha$  und IL-12 (Belge et al., 2002), jedoch vermindert das antiinflammatorische IL-10 (Frankenberger et al., 1996) ausschütten und dass es bei verschiedensten inflammatorischen Erkrankungen zu einem Anstieg der CD16+ Monozytenzahlen kommt (Ziegler-Heitbrock, 2007). Weiterhin stellte sich heraus, dass sich CD16- und CD16+ Monozyten hinsichtlich der Expression ihres jeweiligen Repertoires an Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren (CCR) signifikant unterscheiden. So weisen CD16- Monozyten L-Selektin, den Chemokinrezeptor 2 (CCR2), und in geringem Maße den Fraktalkinrezeptor (CX3CR1) auf ihrer Oberfläche auf. Im Gegensatz dazu exprimieren CD16+ Monozyten kein CCR2, aber signifikant mehr CX3CR1, VLA-4, CD11c, CD11d, CD11a, CD18 und MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche (Ancuta et al., 2003; Gordon and Taylor, 2005; Steppich et al., 2000). Die subpopulationsspezifische Verteilung von Adhäsionsmolekülen (VLA-4, CD11c, CD11d, CD11a, CD18) veranlasste Steppich und Mitarbeiter im Jahr 2000 zu postulieren, dass CD16+ Monozyten im „Marginalen Pool“ am Endothel residieren (Steppich et al., 2000). Der Beweis dieses Postulats konnte funktionell dadurch geführt werden, dass körperliche Belastung im anaeroben Bereich zu einem schnellen Anstieg der CD16+ Monozytenzahlen beim Menschen führte und dieser Anstieg durch Blockade des  $\beta$ -adrenergen Systems mittels Propranolol gemindert werden konnte. Eine Schlussfolgerung der Autoren war, dass das  $\beta$ -adrenerge System gewissermaßen als Stresssignalgeber einen Anstieg der

CD16+ Monozytenzahlen bei verschiedensten inflammatorischen Prozessen, so etwa auch bei der Sepsis mit verursacht.

Kurz darauf widmeten sich mehrere Studien der Untersuchung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf Monozyten. Hierbei weckte vor allem Fraktalkin (CX3CL1) das wissenschaftliche Interesse, da es sich um den einzigen Vertreter der CX3C-Chemokinklasse handelt, da es in Gegensatz zu anderen Chemokinen sowohl in löslicher als auch in membrangebunder Form vorkommt (Charo and Ransohoff, 2006), und da es offensichtlich eine bedeutende Rolle in der Atherosklerose einnimmt (Combadiere et al., 2003; Damas et al., 2005).

Zunächst untersuchten Ancuta et al. in vitro den CX3R1/CX3L1-Pathway bei CD16+ Monozyten. Die Autoren vermochten darzulegen, dass CD16+ Monozyten im Gegensatz zu CD16- Monozyten an aktivierte, Fraktalkin exprimierende Endothelien adhäreren (Ancuta et al., 2003), dort akkumulieren (Ancuta et al., 2004) und proinflammatorische Zytokine (IL-6), Chemokine (CCL2) und Matrixmetalloproteinase-9 bilden (Ancuta et al., 2006), sodass als Schlussfolgerung dieser in vitro Experimente, den CD16+ Monozyten eine herausragende Rolle bei der Rekrutierung von CCR2 exprimierenden Zellen, CD16- Monozyten und T-Lymphozyten, in der Atherosklerose zugeschrieben wurde.

Die Beschreibung der Monozytenheterogenität im Jahre 2003 im Mausmodell ermöglichte es schließlich auch, die in vivo Untersuchung von Monozytensubpopulationen in Atherosklerosemodellen (Geissmann et al., 2003) durchzuführen. Im Vergleich zu humanen Monozyten, exprimieren Maus-Monozyten kein CD16 Antigen auf der Zelloberfläche, weshalb anhand alternativer Marker - L-Selektin (CD62L), CCR2, Ly6C, CX3CR1 - zu menschlichen Monozyten analoge Subpopulationen differenziert werden. Als Äquivalent der CD16- Monozyten werden in der Maus die Monozyten betrachtet, welche L-Selektin (CD62L), CCR2 und den Marker Ly6C, jedoch wenig CX3CR1 aufweisen. Im Gegensatz dazu sind murine Monozyten, welche weder CCR2 noch Ly6C, aber deutlich CX3CR1 exprimieren, äquivalent zu CD16+ Monozyten.

Nachfolgend konnte in vivo die Differenzierung und Migration von murinen Monozytenpopulationen untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass Monozyten als Ly6C+CX3CR1+ Monozyten (CD16- Äquivalente) aus dem Knochenmark

ausgeschwemmt werden (Sunderkotter et al., 2004) und sich in der Folge zu Ly6C-CXC3R1++ Monozyten (CD16+ Äquivalente) entwickeln (Tacke and Randolph, 2006).

Im Jahr 2007 wurde schließlich tierexperimentell die Rolle von Monozytensubpopulationen in der Atherosklerose bestätigt (Tacke et al., 2007). Tacke und Mitarbeiter konnten darlegen, dass sowohl Ly6C+ als auch Ly6C- Monozyten in vivo in atherosklerotische Läsionen von Apolipoprotein E defizienten (apoE<sup>-/-</sup>) Mäusen einwandern. Hierzu verwenden die beiden Monozytensubpopulationen unterschiedliche Chemokinrezeptoren, was wiederum die funktionellen Unterschiede von Ly6C+ und Ly6C- Monozyten unterstreicht: Ly6C+ Monozyten sind bei der Plaqueinvasion sowohl auf CCR2, CX3CR1 und partiell auf CCR5 angewiesen, wohingegen Ly6C- Monozyten vor allem CCR5 zur Immigration in atherosklerotische Plaques benötigen (Tacke et al., 2007).

Kurz darauf publizierte Auffray über ein, von den Autoren als „patrollierendes Verhalten“ bezeichnetes, Zirkulations- und Migrationsmuster der Ly6C- Monozyten (CD16+ Äquivalente) (Auffray et al., 2007). Dieses Verhaltensmuster der Ly6C- Monozyten zeichnet sich dadurch aus, dass Ly6C-Monozyten fest am Endothel haften, sich am Endothel entlang bewegen - interessanterweise auch gegen die Blutflussrichtung - und auf inflammatorische Stimuli rasch transendothelial migrieren können. Nach Verlassen des Gefäßbettes sezernieren Ly6C-Monozyten proinflammatorische Zytokine und differenzieren zu Makrophagen. Aus diesem Grund stellten die Autoren die Hypothese auf, dass diese Monozytensubpopulation eine spezifische Rolle in der Atherosklerose inne habe und dass diese Subpopulation als therapeutischer Ansatzpunkt dienen könne.

Die oben geschilderte Monozytenheterogenität in immunphänotypisch und funktionell differente Subpopulationen gewinnt zusätzlich noch an Komplexität, da beim Menschen die Differenzierung von CD16+ Monozyten in zwei weitere Populationen durch Ancuta beschrieben wurde, obgleich die biologische Bedeutung der Differenzierung von CD16+ Monozyten in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten bis heute noch nicht aufgeklärt ist (Ancuta et al., 2003).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich die beiden CD16+ Monozytensubpopulationen hinsichtlich der Expression von Angiotensin Converting Enzyme unterscheiden (Ulrich et al., 2006).

---

### 5.3 Monozytenheterogenität und subklinische Atherosklerose

---

Unserer Arbeitsgruppe gelang es kürzlich erstmals, in Querschnittstudien bei kardiovaskulären Hochrisiko-Patienten Zusammenhänge zwischen Zellzahlen einzelner Monozytensubpopulationen und systemischer Atherosklerose zu beschreiben (Schlitt et al., 2004; Ulrich et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich nun erstmals bei kardiovaskulär Gesunden eine signifikante Korrelation zwischen CD16+ Monozyten und der Intima-Media-Dicke (IMT) als Marker der subklinischen Atherosklerose. Weder die Gesamtmonozytenzahl, noch die Zellzahl der CD16- Monozyten, steht in einem statistisch signifikanten Zusammenhang mit der IMT. Diese streng subpopulationsspezifische Korrelation zwischen CD16+ Monozyten und der IMT könnte auch die Ergebnisse der CUDAS- und der Tromsø-Studie erklären (Chapman et al., 2004; Johnsen et al., 2005). Bei den aufgeführten Arbeiten handelt es sich um die beiden einzigen epidemiologische Studien in der Allgemeinbevölkerung, welche Gesamtmonozytenzahlen und die subklinische atherosklerotische Veränderungen der Halsschlagadern erfassten. So konnten in der CUDAS- und der Tromsø-Studie nur bei Subgruppen eine Assoziation von zirkulierenden Monozyten mit der Intima-Media-Dicke, oder dem Neuauftreten atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden.

In der Tromsø-Studie, welche insgesamt 6272 Teilnehmer einschloss, zeigte sich lediglich in der Subgruppe von 2610 Probanden, welche initial keine Plaques in ihren Carotiden aufwiesen, nach einem Nachbeobachtungszeitraum von sieben Jahren eine statistisch signifikante Assoziation von Monozytenzahlen und dem Neuauftreten atherosklerotischer Plaques. Als Plaque wurde hierbei eine lokalisierte Vorwölbung der Gefäßwand definiert, welche >50% Dicke im Vergleich zu den angrenzenden Gefäßwandabschnitten einnahm. Vor dem Hintergrund der weiten Altersspanne (25 bis 82 Jahre) und der uns von uns gemachten Erfahrung, dass Carotis-Plaques bei Personen die jünger als 45 Jahre sind, kaum anzutreffen sind, ist davon auszugehen, dass die berichtete Assoziation in der Tromsø-Studie vor allem durch den Einschluss älterer Personen mit einem relativ hohen Atheroskleroserisiko bedingt ist. Diese Vermutung wird zusätzlich durch das hohe Durchschnittsalter von  $56,7 \pm 10,5$  Jahren dieser 2610 Probanden untermauert.

In der Gesamtpopulation der 6272 Teilnehmer zeigte sich weder bei Studieneinschluss, noch bei der Abschlussuntersuchung eine Assoziation zwischen Monozytenzahlen und der IMT.

Die australische CUDAS-Studie, eine Querschnittsstudie an 1111 Probanden, konnte eine Assoziation von Gesamtmonozytenzahlen und dem Vorhandensein von Carotis-Plaques nachweisen, jedoch keine Korrelation von Monozytenzahlen und der IMT in der Gesamtpopulation zeigen. In der Subgruppenanalyse zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen Monozytenzahlen und der Intima-Media-Dicke bei den männlichen Teilnehmern der Gesamtpopulation, sowie bei Studienteilnehmer beider Geschlechter im Alter von >53 Jahren. Wie auch in der Tromsø-Studie konnte also erst durch die Betrachtung einer Subgruppe mit höherem Risikoprofil ein Zusammenhang zwischen Monozyten und Atherosklerose gesehen werden.

Die I LIKE HOME Studie unterscheidet sich wesentlich von diesen beiden Studien. Zum einen wurden Monozytensubpopulationen anstelle der Gesamtmonozyten bestimmt, zum anderen stellt das Probandenkollektiv von I LIKE HOME ein kardiovaskuläres Niedrig-Risikokollektiv dar: Nahezu zwei Drittel der Probanden sind weiblich, das Durchschnittsalter beträgt 42 Jahre. Im Gegensatz dazu betrug das Durchschnittsalter in der CUDAS-Studie 53,3 Jahre bei einem ausgewogenen Geschlechterverhältnis; in der Tromsø-Studie war das mittlere Probandenalter 56,7 Jahre, der Frauenanteil betrug 56,2%. Somit weisen die I LIKE HOME Teilnehmer das niedrigste kardiovaskuläre Risiko dieser drei Studien auf.

Wie auch bei den zuvor zitierten Studien, sieht man in der I LIKE HOME Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Gesamtmonozytenzahlen und der Intima-Media-Dicke. Allerdings fällt bei Analyse der Monozytensubpopulationen in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD16+ Monozyten und subklinischer Atherosklerose auf. Dies ist im Einklang mit bereits publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe, welche belegen, dass CD16+ Monozyten in der kardiovaskulären Hochrisikogruppe der Dialysepatienten mit der kardiovaskulären Ereignisrate (Heine et al., 2007; Ulrich et al., 2008), und bei Nierentransplantierten mit subklinischer Atherosklerose assoziiert sind (Heine et al., 2007; Ulrich et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit ist die Assoziation zwischen CD16+ Monozyten und der Intima-Media-Dicke hauptsächlich über die Korrelation dieser Monozytensubpopulation mit traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren zu erklären. Im Einzelnen handelt es sich um Assoziationen von CD16+ Monozyten mit dem mittlerem arteriellem Blutdruck, niedrigeren HDL-Cholesterin Werten, höherem Body-Mass-Index, höherem Alter und männlichem Geschlecht. Nach Korrektur für kardiovaskulären Risikofaktoren mittels eines Multiregressionmodells, welches Monozytensubpopulationen, Geschlecht, Gesamtcholesterin, mittleren arteriellen Blutdruck, BMI, Alter und Vorhandensein von Diabetes mellitus einbezieht, zeigt sich dass lediglich das Alter, männliches Geschlecht und mittlerer Blutdruck unabhängige Prädiktoren der Intima-Media-Dicke sind. Bei den erwähnten Korrelation zwischen CD16+ Monozyten und den kardiovaskulären Risikofaktoren, handelt es sich mit Ausnahme der Assoziation mit dem Lipidstoffwechsel um bisher noch nicht vorbeschriebene Erkenntnisse (Rothe et al., 1996; Rothe et al., 1999). Welche Faktoren im Einzelnen hierfür verantwortlich sind, ist aktuell noch vollkommen unklar.

Bemerkenswert ist vor allem die starke Korrelation zwischen CD16+ Monozyten - derjenigen Monozytensubpopulation welche traditionell als proinflammatorisch betrachtet wird - und dem Body-Mass-Index. Durch mehrere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Fettgewebe von Adipösen im Vergleich zu Normalgewichtigen, vermehrt proinflammatorische Proteine, etwa TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1, CRP und MCP-1 (Shoelson et al., 2006), exprimiert und Inflammation einen pathogenetisch wichtigen Faktor für die Entstehung von Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom darstellt (Shoelson et al., 2006). Dieser inflammatorische Zustand wird auf zelluläre Ebene durch die Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe bedingt; Makrophagen sind die Hauptproduzenten von proinflammatorischem TNF- $\alpha$  im Fettgewebe und darüber hinaus korreliert ihre Anzahl mit dem BMI und der Adipozytengröße (Weisberg et al., 2003). Zudem haben hohe TNF- $\alpha$  Spiegel einen direkten Einfluss auf die Insulinsensibilität des Organismus, da TNF- $\alpha$  eine Insulinresistenz und eine vermehrte Lipolyse in Adipozyten verursacht (Shoelson et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wäre es demnach denkbar, dass zirkulierende Monozyten und ortständige Makrophagen bei der Entstehung von Adipositas und der Insulinresistenz als zelluläre Protagonisten eine vergleichbare Rolle, wie in der

Atherogenese einnehmen. Welche Monozytensubpopulationen hierbei eine Rolle spielen ist aktuell noch nicht sicher geklärt.

Wie oben aufgeführt, wurde 2003 erkannt, dass CD16<sup>+</sup> Monozyten weiter in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unterteilt werden können (Ancuta et al., 2003). Diese noch genauere Differenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit vorgenommen. Bei Analyse der beiden CD16<sup>+</sup> Monozytenpopulationen - CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten - stellt sich heraus, dass CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten für die Assoziationen mit der IMT und den kardiovaskulären Risikofaktoren verantwortlich sind. Insbesondere zeigt sich zwischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und dem Body-Mass-Index eine bemerkenswerte Korrelation, sodass unsere Ergebnisse erstmals eine bestimmte Monozytensubpopulation mit Adipositas und eventuell dem metabolischen Syndrom in Bezug setzen. Da leider lediglich der BMI und nicht das Verhältnis von Hüft- zu Taillenumfang bestimmt wurde, kann aus den vorliegenden Daten keine genaue Aussage bezüglich des metabolischen Syndroms getroffen werden, da der Hüft-/Taillenumfang in dessen Definition mit einfließt.

Eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe bei Dialysepatienten untermauerte nicht nur die Bedeutung zur Differenzierung von CD16<sup>-</sup> und CD16<sup>+</sup> Monozyten; vielmehr konnte gezeigt werden, dass in diesem kardiovaskulären Hochrisiko-Kollektiv die Unterscheidung der zwei CD16<sup>+</sup> Subpopulation von klinischer Relevanz war. In einer Population von 94 Dialysepatienten wurden zu Beginn der Studie die Monozytensubpopulationen bestimmt und die Patienten über einen mittleren Zeitraum von 35 Monaten nach beobachtet. Patienten in der höchsten Quartile CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytenzahlen hatten eine höhere kardiovaskuläre Ereignisrate im Vergleich zu den anderen Quartilen. In der Multiregressionanalyse sah man, dass die Anzahl der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unabhängiger Prädiktor des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse und des Überlebens war (Heine et al., 2007).

In der Zusammenschau ergibt sich das Bild, dass bei Gesunden CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten mit der Prävalenz von Atherosklerose assoziiert sind, und dass CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in dem kardiovaskulären Hochrisiko-Kollektiv der Dialysepatienten mit dem Neuauftreten atherosklerotisch bedingter Ereignisse vergesellschaftet sind.

Darüber hinaus zeigt sich in der vorliegenden Arbeit ein subpopulationsspezifischer Effekt von Nikotinkonsum auf CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten; Raucher weisen im Vergleich zu Nicht-Rauchern weniger CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten auf. Dies erscheint zunächst irritierend, da dies im Gegensatz zu den beobachteten Korrelationen von CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und den übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren zu stehen scheint. Allerdings finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass Inhaltsstoffe des Tabakrauches, so zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die Differenzierung von Monozyten in der Zellkultur hin zu Dendritischen Zellen hemmen (Laupeze et al., 2002; van Grevenynghe et al., 2003). Angesichts der Tatsache, dass die Differenzierung von klassischen CD16<sup>-</sup> Monozyten zu Dendritischen Zellen über CD16<sup>+</sup> Monozyten läuft, ist es nahe liegend, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe die Bildung von CD16<sup>+</sup> Monozyten negativ beeinflussen und somit sekundär die Bildung von Dendritischen Zellen hemmen.

In der I LIKE HOME Studie zeigt sich, dass auch bei Rauchern höhere Zellzahlen der CD16<sup>+</sup> Monozyten mit subklinischer Atherosklerose und den kardiovaskulären Risikofaktoren (Blutdruck, Cholesterin, BMI, Alter, männliches Geschlecht) assoziiert sind.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern somit gemeinsam mit den Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe weitere Hinweise für die biologische Bedeutung der Differenzierung in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten.

## 5.4 Limitationen

---

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine Querschnittsstudie handelt, können lediglich Assoziationen und keine Kausalitäten aufgezeigt werden. Darüber hinaus war die Zielsetzung, eine Niedrigrisiko-Kohorte zu untersuchen. Dies birgt eine weitere Einschränkung in sich, da nahezu alle Messungen der IMT Werte im Normalbereich ergaben. Somit scheint die sonographische Bestimmung der IMT in diesem Kollektiv ein relativ unsensitives Verfahren zur Abschätzung subklinischer Atherosklerose zu sein.

Daraus ergeben sich wiederum die erwartungsgemäß moderaten Korrelationskoeffizienten zwischen der IMT und den einzelnen Monozytensubpopulationen.

Zudem wurde bei der Bestimmung der Intima-Media-Dicke, im Gegensatz zu anderen Studien, bewusst die Bestimmung der IMT auf die Hinterwand der A. carotis communis beschränkt, da eine Zunahme der Validität durch Messung der IMT an Vorderwand und Hinterwand des Gefäßes unklar ist (Bots et al., 2003). Darüber hinaus ist die Reliabilität der IMT-Messung an der Hinterwand wegen technisch einfacherer Durchführbarkeit ungleich höher als die Reliabilität der Messung an Hinterwand und Vorderwand.

Trotz dieser methodischen Einschränkung weist die hohe Korrelation zwischen IMT und klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren auf die hinreichende Validität und Präzision der IMT Messungen hin.

Weiterhin konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Bestimmung des Verhältnisses von Taillen- zu Hüftumfang der Errechnung des Body-Mass-Indexes in der Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse überlegen ist (Yusuf et al., 2005). Zum Zeitpunkt der Initiierung der I LIKE HOME Studie war dies allerdings nicht allgemein bekannt, sodass der BMI als alleiniges Maß der Adipositas gewählt wurde. Wie zuvor erwähnt, ergibt sich daraus allerdings die fehlende Möglichkeit, um Aussagen über einen Zusammenhang zwischen CD14+CD16+ Monozyten und dem metabolischen Syndrom zu treffen.

In der Zusammenschau ergeben sich somit einzelne methodische Limitationen, welche allerdings eher in einer Unterschätzung der Assoziation zwischen immunologischen Markern und subklinischer Atherosklerose als in falsch positiven Befunden resultieren, sodass bei Anwendung alternativer und sensitiverer methodischer Verfahren stärkere Korrelationen zum Vorschein treten müssten.

## **5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

---

Die einleitend gestellten Hypothesen können folgendermaßen beantwortet werden:

1. Hypothese

Bei Gesunden ohne manifeste koronare Herzkrankheit korrelieren CD16+ Monozyten mit der Intima-Media-Dicke der Arteriae carotides communes als einem Marker der subklinisch Atherosklerose.

## 2. Hypothese

Bei Gesunden ohne manifeste koronare Herzkrankheit korrelieren CD16+ Monozyten mit dem kardiovaskulären Risikoprofil bestimmt durch die Faktoren höheres Alter, höherer Body-Mass-Index, höherer mittlerer arterieller Blutdruck und niedrigerem HDL-Cholesterin.

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, die Assoziation zwischen einer spezifischen Monozytensubpopulation und kardiovaskulären Risikofaktoren, sowie subklinischer Atherosklerose in einem Niedrig-Risikokollektiv aufzuzeigen. Die meisten bisherigen epidemiologischen Studien, welche den Einfluss chronischer Inflammation auf Atherosklerose untersuchten, haben lösliche Inflammationsmarker, in der Mehrzahl der Fälle das CRP, untersucht. Zelluläre Marker der Inflammation wurden meist als Gesamtzahl der Leukozyten oder vereinzelt als Differentialblutbild bestimmt. Wir postulieren, dass die Bestimmung eines zellulären Markers zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos von Vorteil ist, da ein derartiger Marker die komplexen Interaktionen der verschiedenen Risikofaktoren besser abzubilden scheint, als ein einzelner humoraler Faktor.

Zukünftige Studien müssen CD16+ Monozyten detaillierter untersuchen und Faktoren identifizieren, welche zur Expansion dieser Zellen führen. Denkbar wäre es, die zur Expansion führenden Faktoren oder die CD16+ Monozyten selbst spezifisch therapeutisch zu beeinflussen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Ross R, 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126.
2. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH, 1997. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* 336: 973-979.
3. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL, 2004. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 109: IV6-19.
4. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, III, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, 2003. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 107: 499-511.
5. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V, 2004. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 350: 1387-1397.
6. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS, 2006. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N. Engl. J. Med.* 355: 2631-2639.
7. Hansson GK, 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352: 1685-1695.
8. Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW, 2004. Leukocyte count and coronary heart disease: Implications for risk assessment. *J Am Coll Cardiol* 44: 1945-1956.
9. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB, Intermountain Heart Collaborative (IHC) Study Group, 2005. Which White Blood Cell Subtypes Predict Increased Cardiovascular Risk? *J Am Coll Cardiol* 45: 1638-1643.
10. Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W, for the CAPRIE Investigators, 2004. Leukocyte Count as an Independent Predictor of Recurrent Ischemic Events. *Stroke* 35: 1147-1152.

11. Gurm HS, Bhatt DL, Lincoff AM, Tcheng JE, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Jia G, Topol EJ, 2003. Impact of preprocedural white blood cell count on long term mortality after percutaneous coronary intervention: insights from the EPIC, EPILOG, and EPISTENT trials. *Heart* 89: 1200-1204.
12. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL, 2002. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat. Med.* 8: 1218-1226.
13. Glass CK, Witztum JL, 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104: 503-516.
14. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ, 2004. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels  
7. *Thromb Haemost.* 92: 419-424.
15. Hume DA, 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 49-53.
16. Hume DA, 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 49-53.
17. Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG, 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79: 503-511.
18. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW, 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534.
19. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt 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.
20. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW, 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373-377.
21. Belge KU, 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.
22. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Heitbrock HW, 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82: 3170-3176.
23. Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L, 2002. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine

- production. *Eur. J Immunol* 32: 1319-1327.
24. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Lusinskas FW, Gabuzda D, 2003. Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *J. Exp. Med.* 197: 1701-1707.
  25. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z, 2003. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in CX3CR1/Apolipoprotein E Double Knockout Mice. *Circulation* 107: 1009-1016.
  26. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T, 2004. Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 34-40.
  27. del Sol AI, Moons KGM, Hollander M, Hofman A, Koudstaal PJ, Grobbee DE, Breteler MMB, Witteman JCM, Bots ML, 2001. Is Carotid Intima-Media Thickness Useful in Cardiovascular Disease Risk Assessment? : The Rotterdam Study. *Stroke* 32: 1532-1538.
  28. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL, 2002. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat. Med.* 8: 1218-1226.
  29. Getz GS, 2005. Thematic review series: The Immune System and Atherogenesis. Immune function in atherogenesis. *J. Lipid Res.* 46: 1-10.
  30. Nahrendorf M, Zhang H, Hembrador S, Panizzi P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Swirski FK, Weissleder R, 2008. Nanoparticle PET-CT Imaging of Macrophages in Inflammatory Atherosclerosis. *Circulation* 117: 379-387.
  31. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, Weissleder R, 2006. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10340-10345.
  32. Chapman CML, Beilby JP, McQuillan BM, Thompson PL, Hung J, 2004. Monocyte Count, But Not C-Reactive Protein or Interleukin-6, Is an Independent Risk Marker for Subclinical Carotid Atherosclerosis. *Stroke* 35: 1619-1624.
  33. Johnsen SH, Fosse E, Joakimsen O, Mathiesen EB, Stensland-Bugge E, Njolstad I, Arnesen E, 2005. Monocyte Count Is a Predictor of Novel Plaque Formation: A 7-Year Follow-up Study of 2610 Persons Without Carotid Plaque at Baseline The Tromso Study. *Stroke* 36: 715-719.
  34. Passlick B, Fliieger D, Ziegler-Heitbrock HW, 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood 45. *Blood* 74: 2527-2534.

35. Belge KU, 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  
52. *J Immunol* 168: 3536-3542.
36. Ziegler-Heitbrock L, 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81: 584-592.
37. Gordon S, Taylor PR, 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
38. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HWL, 2000. Selective mobilization of CD14+CD16+ monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C578-C586.
39. Charo IF, Ransohoff RM, 2006. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med* 354: 610-621.
40. Damas JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O, 2005. Expression of Fractalkine (CX3CL1) and its Receptor, CX3CR1, Is Elevated in Coronary Artery Disease and Is Reduced During Statin Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2567-2572.
41. 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.
42. Ancuta P, Wang J, Gabuzda D, 2006. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol* 80: 1156-1164.
43. Geissmann F, Jung S, Littman DR, 2003. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19: 71-82.
44. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJM, 2004. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *J Immunol* 172: 4410-4417.
45. Tacke F, Randolph GJ, 2006. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211: 609-618.
46. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van RN, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ, 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin. Invest* 117: 185-194.
47. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F, 2007. Monitoring of Blood Vessels and

- Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317: 666-670.
48. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Lusinskas FW, Gabuzda D, 2003. Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes 56. *J. Exp. Med.* 197: 1701-1707.
  49. Ulrich C, Heine GH, Garcia P, Reichart B, Georg T, Krause M, Kohler H, Girndt M, 2006. Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21: 1596-1602.
  50. Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Kohler H, Girndt M, 2008. Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes Are Associated With Subclinical Atherosclerosis in Renal Transplant Patients. *American Journal of Transplantation* 8: 103-110.
  51. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Kohler H, Girndt M, 2007. CD14++CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73: 622-629.
  52. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G, 1996. Peripheral Blood Mononuclear Phagocyte Subpopulations as Cellular Markers in Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1437-1447.
  53. Rothe G, Herr AS, Stohr J, Abletshauer 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 5. *Atherosclerosis* 144: 251-261.
  54. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB, 2006. Inflammation and insulin resistance 1. *J Clin. Invest* 116: 1793-1801.
  55. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue 1. *J Clin. Invest* 112: 1796-1808.
  56. Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, Fardel O, 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Affect Functional Differentiation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells 100. *J Immunol* 168: 2652-2658.
  57. van Grevenynghe J, Rion S, Le FE, Le VM, Amiot L, Fauchet R, Fardel O, 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages 1. *J Immunol* 170: 2374-2381.
  58. Bots ML, Evans GW, Riley WA, Grobbee DE, 2003. Carotid Intima-Media Thickness Measurements in Intervention Studies: Design Options, Progression

Rates, and Sample Size Considerations: A Point of View. *Stroke* 34: 2985-2994.

59. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai J, Razak F, Sharma AM, Anand SS, 2005. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *The Lancet* 366: 1640-1649.

## 7 DANKSAGUNG

---

**Ohne die Unterstützung folgender Personen, denen ich meinen Dank aussprechen möchte, wäre die vorliegende Arbeit nicht entstanden:**

Zu besonderem Dank bin ich meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Gunnar Heine verpflichtet. Er stellte mir das Thema zur Verfügung, war immer für auftretende Probleme ansprechbar und hatte jederzeit „pfiffige Ideen“ zur Problemlösung parat.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Köhler und Herrn Prof. Dr. med. D. Fliser für die Möglichkeit zur Promotion in der Klinik für Innere Medizin IV und die Unterstützung der I LIKE HOME Studie.

Herrn Prof. Dr. med. M. Girndt gilt für seine Unterstützung bei der Umsetzung der I LIKE HOME Studie besonderer Dank.

Herrn Dr. rer. nat. Christof Ulrich danke ich, für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor, insbesondere in die Durchflusszytometrie und seine unermüdliche Hilfe in allen Belangen. Gleichermaßen war Frau Martina Wagner mit technischer Assistenz jederzeit zur Stelle und hat gemeinsam mit Herrn Dr. rer. nat. Ulrich einen herausragenden Beitrag zur Umsetzung der I LIKE HOME Studie geleistet.

Lutz Blömer, Kathrin Oster und Maren Ziegelin waren als Mitglieder des I LIKE HOME Studien-Teams im Rahmen ihrer jeweiligen Promotionsarbeit maßgeblich für das Gelingen der Studie verantwortlich.

Die Mitarbeiter der Betriebsärztlichen Dienststelle, allen voran Frau Briehl, Frau Metzger und Frau Weiser, waren hauptverantwortlich für die reibungslose und zahlreiche

Rekrutierung der Probanden. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Yvonne Grenner und den weiteren ärztlichen Mitarbeitern der Betriebsärztlichen Dienststelle für die Möglichkeit zur Kooperation und für die Unterstützung des reibungslosen Studienablaufes.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und das Ermöglichen meines Studiums.

## 8 PRÄSENTATIONEN

---

Teilergebnisse wurden im Rahmen von Vorträgen, Posterpräsentationen vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht.

1. Rogacev, K. S.; Heine, G. H.; Ulrich, C.; Blömer, L.; Oster, K.; Ziegelin, M.; Schlitt, A.; Grenner, Y.; Geisel, J.; Köhler, H.; Girndt M. - Subklinische Atherosklerose bei geringgradiger Einschränkung der Nierenfunktion - Die „I LIKE HOME Studie“ (Inflammation, Lipid Metabolism and Kidney Disease in Early Atherogenesis - The Homburg Evaluation). 38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2007. (*Freier Vortrag*)
2. Rogacev, K.; Heine, G. H.; Ulrich, C.; Schlitt, A.; Grenner, Y.; Geisel, J.; Köhler, H.; Girndt, M. Subklinische Atherosklerose - Die Rolle der Monozytenheterogenität. 73. Jahrestagung der DGK in Mannheim 2007. (*Posterpräsentation*)
3. Heine, G.; Blömer, L.; Rogacev, K.; Ulrich, C.; Grenner, Y.; Köhler, H.; Girndt, M. Gesamtleukozyten und Monozyten sind signifikante Prädiktoren der Intima-Media-Dicke der Carotiden. (*Veröffentlichter Vortrag; European Journal of Ultrasound 26[S1], 2005*)
5. Heine, G. H.; Ulrich, C.; Blömer, L.; Oster, K.; Rogacev, K.; Grenner, Y.; Schlitt, A.; Geisel, J.; Köhler, H.; Girndt, M. Monocyte subsets in early atherosclerosis - lessons learnt AT HOME. (*Veröffentlichter Postervortrag; Journal of Thrombosis and Haemostasis 3: 2005*)
6. Heine, G. H.; Rogacev, K.; Ulrich, C.; Schlitt, A.; Grenner, Y.; Köhler, H.; Girndt, M. Raucher und Nichtraucher unterscheiden sich in der Verteilung proinflammatorischer Monozytensubpopulationen. 28. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2004 (*Posterpräsentation*)

---

## 9 ANHANG

---

### 9.1 Tabellenverzeichnis

---

Tab.01:	Verbrauchsmaterialien.	S.18
Tab.02:	Geräte.	S.19
Tab.03:	Monoklonale Antikörper.	S.20
Tab.04:	Substanzen.	S.20
Tab.05:	Herstellung von Puffern und Medien.	S.21
Tab.06:	Pipetierschema.	S.29
Tab.07:	Software.	S.31
Tab.08:	Charakteristika des Studienkollektivs.	S.33
Tab.09:	Übersicht der Korrelationen zwischen Leukozyten-, Monozytensubpopulationen mit kardiovaskulären Risikofaktoren.	S.43
Tab.10:	Multiregressionsanalyse mit der Intima-Media-Dicke als abhängiger Variable.	S.44

### 9.2 Abbildungsverzeichnis

---

Abb.01:	Messung der Intima-Media-Dicke.	S.26
Abb.02:	Gatingstrategie zur Erfassung der Monozytenheterogenität.	S.30
Abb.03:	Häufigkeitsverteilung der mittleren Intima-Media-Dicke.	S.34
Abb.04:	Korrelation der Intima-Media-Dicke mit dem Alter bzw. BMI.	S.36

Abb.05:	Korrelation der Intima-Media-Dicke mit dem mittleren Blutdruck, respektive dem Gesamtcholesterin.	S.37
Abb.06:	Inverse Korrelation der Intima-Media-Dicke mit dem HDL-Cholesterin.	S.38
Abb.07:	Darstellung der Intima-Media-Dicke in Abhängigkeit steigender CD16+, bzw. CD14+CD16+ Monozytenzahlen eingeteilt in Quintile.	S.42

### 9.3 Fragebogen

---

Fragebogen basierend auf: Rose, G. A.; Cardiovascular survey methods, 2nd. Ed. Geneva: WHO, 1982

Untersuchungsdatum \_\_.\_\_.200\_\_

Proband \_\_\_\_\_ Geburtsdatum \_\_\_\_\_ Geschlecht \_\_\_\_\_

Körpergröße ohne Schuhe \_\_\_\_\_

Körpergewicht leicht bekleidet \_\_\_\_\_

01. Hatten Sie jemals Schmerzen oder Beschwerden in Ihrem Brustkorb?

O Ja

O Nein (*falls Nein, bitte Fragen 2-9 überspringen, weiter mit 10*)

02. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls Nein, weiter mit Frage 9*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

03. Bekommen Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

04. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen bekommen?

O Ich halte an oder laufe langsamer

O Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 9*)

*Bei Benutzung von Nitrospray: „Ich halte an oder laufe langsamer“ ankreuzen.*

05. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

O Es kommt zu einer Erleichterung

O Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 9*)

06. Wie rasch?

O Innerhalb von 10 Minuten.

O Nicht innerhalb von 10 Minuten (*weiter mit Frage 9*).

07. Zeigen Sie mir bitte, wo die Schmerzen oder die Beschwerden lokalisiert sind.

O Sternum (oberes oder mittleres Drittel)

O Sternum (unteres Drittel)

O Linksseitige vordere Brustwand

O Linker Arm

*(alle Angaben notieren)*

08. Haben Sie diese Schmerzen oder Beschwerden sonstwo?

O Ja (*notieren wo \_\_\_\_\_*)

O Nein

09. Hatten Sie jemals einen schweren Schmerz über die Vorderseite Ihres Brustkorbes, der über dreißig Minuten oder länger anhielt?

O Ja

O Nein

10. Bekommen Sie Schmerzen beim Gehen in einem oder beiden Bein?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

11. Begann dieser Schmerz jemals beim Stehen in Ruhe oder beim Sitzen?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

12. Wo im Bein empfinden Sie diesen Schmerz?

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel ein.

O Der Schmerz bezieht den oder die Unterschenkel nicht ein (*weiter Frage 19*)

13. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Bergangehen oder raschen Gehen?

O Ja

O Nein (*falls nein, weiter mit Frage 19*)

O Ich gehe nicht bergan und gehe nicht rasch.

14. Bekommen Sie diesen Schmerz beim Gehen in normalem Tempo in der Ebene?

O Ja

O Nein

15. Ist der Schmerz jemals während des Gehens verschwunden?

O Ja (*falls ja, weiter mit Frage 19*)

O Nein

16. Was machen Sie, wenn Sie diese Schmerzen oder Beschwerden beim Gehen

bekommen?

Ich halte an oder laufe langsamer

Ich laufe weiter (*weiter mit Frage 19*)

17. Wenn Sie anhalten, was passiert mit diesem Schmerzen oder diesen Beschwerden?

Es kommt zu einer Erleichterung

Es kommt zu keiner Erleichterung (*weiter mit Frage 19*)

18. Wie rasch?

Innerhalb von 10 Minuten.

Nicht innerhalb von 10 Minuten

19. Hatten Sie jemals einen Herzinfarkt, eine Bypass-Operation oder eine Aufdehnung von Herzkranzgefäßen mittels Herzkatheter?

Ja

Nein

20. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die länger als 24 Stunden angehalten haben?

Ja

Nein

21. Hatten Sie jemals einen Schlaganfall mit Beschwerden, die kürzer als 24 Stunden angehalten haben, oder plötzlichen Sehverlust über weniger als 24 Stunden?

Ja

Nein

22. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

Ja

Nein

23. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt?

O Ja

O Nein

24. Ist bei Ihnen eine bösartige Tumorerkrankung oder eine chronische Entzündungserkrankung, etwa eine chronische Darmentzündung oder eine chronische Leberentzündung bekannt?

O Ja

O Nein

25. Hatten Sie in den letzten fünf Tagen einen akuten Infekt?

O Ja

O Nein

26. Haben Sie jemals geraucht?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 31*)

27. Rauchen Sie aktuell?

O Ja (*weiter mit Frage 28a*)

O Nein (*nur Frage 28*)

28. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht? \_\_\_\_\_

- 28a. Blutentnahme Uhrzeit \_\_\_\_\_

- 28b. Letzte Zigarette vor Blutentnahme \_\_\_\_\_

- 28c. Insgesamt Anzahl Zigaretten vor Blutentnahme \_\_\_\_\_

29. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht? \_\_\_\_\_

30. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich am Tag geraucht? \_\_\_\_\_

31. Hat Ihr Vater oder Ihre Mutter einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor der 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

32. Hat eines oder mehrere Ihrer Geschwister einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall vor dem 60. Lebensjahr erlitten?

O Ja

O Nein

33. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 35*)

34. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

O Insulin

O Blutzuckersenkende Tabletten

O Diät

35. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mindestens 30 Minuten sportlich in einem Ausmaß, dass Sie ins Schwitzen kommen?

\_\_\_\_\_ (*falls „0“, weiter Frage 37*)

36. Welche Sportarten betrieben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

\_\_\_\_\_

37. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern?

O Ja

O Nein

38. Ist bei Ihnen eine Nierenerkrankung bekannt?

O Ja

O Nein (*weiter mit Frage 40*)

39. Welche Nierenerkrankung ist bei Ihnen bekannt?

\_\_\_\_\_

---

40. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wie viele Gläser Alkohol haben Sie durchschnittlich pro Woche, also von Montag bis Sonntag, getrunken? Wir betrachten 0,35 l Bier, 0,120 l (ein „Achtel“) Wein oder 45 ml Spirituosen als ein Glas Alkohol.

Gesamt \_\_\_\_\_ Gläser

Bier \_\_\_\_\_ Gläser

Rotwein \_\_\_\_\_ Gläser

Weißwein \_\_\_\_\_ Gläser

Spirituosen \_\_\_\_\_ Gläser

41. Nehmen Sie regelmäßig (seit mindestens 14 Tagen täglich) oder gelegentlich (mindestens einmal in den letzten 14 Tagen) Medikamente oder Hormonpräparate wie die Pille ein?

O Ja

O Nein

42. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

\_\_\_\_\_

---

Nach 5 Minuten Ruhe

RR \_\_\_\_ / \_\_\_\_ rechts

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ links

HF \_\_\_\_