

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

# **NIKOTINKONSUM UND MONOZYTENHETEROGENITÄT**

---

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

VORGELEGT VON STÉPHANIE BERTRANG

GEBOREN AM 04. APRIL 1986 NIEDERKORN/LUXEMBURG

# **INHALTSVERZEICHNIS**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	5
SUMMARY.....	6
RESUME.....	7
2. EINLEITUNG .....	9
2.1 Atherosklerose - eine chronisch inflammatorische Erkrankung.....	9
2.2 Monozytensubpopulationen und Atherosklerose .....	11
2.2.1 CD16-positive Monozyten.....	13
2.2.2 Die CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozytensubpopulation.....	14
2.3 Nikotinkonsum und Atherosklerose.....	15
3. MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1 Klinischer Teil.....	17
3.1.1 Studiendesign .....	17
3.1.2 Studienablauf.....	19
3.1.3 Datenanalyse.....	19
3.2 Experimenteller Teil.....	20
3.2.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen.....	20
3.2.2 In vitro Generierung hämatopoetischer CD34 <sup>+</sup> Stammzellen .....	21
3.3 Material .....	22
3.3.1 Substanzen und Medien .....	22
3.3.2 Chemikalien.....	23
3.3.3 Lösungen und Puffer .....	23
3.3.4 Antikörper .....	24
3.3.5 Kits.....	25
3.3.6 Geräte.....	25

3.3.7 Verbrauchsmaterialien .....	26
4. ERGEBNISSE .....	27
4.1 Allgemeine Charakteristika .....	27
4.1.1 Baseline Charakteristika des Studienkollektivs .....	27
4.2 Monozytensubpopulationen .....	29
4.2.1 Monozytensubpopulationen des Studienkollektivs .....	29
4.2.2 Monozytensubpopulationen und kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	30
4.2.3 Monozytensubpopulationen und andere systemische Entzündungsmarker...	31
4.3 Zusammenhang zwischen Rauchen und Monozytensubpopulationen .....	32
4.4. Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die Monozytendifferenzierung .....	36
4.4.1 Differenzierung der Monozyten in vitro unter Einfluss von Benzo(a)pyren und $\alpha$ -Naphthoflavin .....	36
4.4.2 Einfluss der Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors auf die in vitro Differenzierung der Monozytensubpopulationen.....	36
5. DISKUSSION .....	38
5.1 Monozytensubpopulationen als Entzündungsmarker.....	38
5.2 Monozytensubpopulationen und Atherosklerose .....	38
5.2.1 Monozytensubpopulationen bei chronischen Nierenerkrankungen.....	38
5.2.2 Monozytensubpopulationen bei Schlaganfall und Koronarer Herzerkrankung .....	39
5.3 Nikotinkonsum und Monozytensubpopulationen.....	41
5.4 Fazit und Ausblick.....	44
6. Literaturverzeichnis .....	46
7. Danksagung.....	51
8. Anhang .....	52
Abbildungsverzeichnis .....	52

Tabellenverzeichnis.....	52
Fragebogen.....	53

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACE	Angiotensin converting enzyme
AHR	Arylhydrocarbonrezeptor
BMI	Body-Mass-Index
BP	Benzo(a)pyren
BSA	Bovine serum albumin
CCR	Chemokine (CC motif) receptor
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal Calf Serum
H2DFFDA	5 - (und-6)-Carboxy-2', 7'-dihydrofluorescein
HDL	High density lipoprotein
HLA	Human leucocyte antigen
IL	Interleukin
LDL	Low density lipoprotein
LPS-Rezeptor	Lipopolysaccharid-Rezeptor
LSM	Lymphocyte Separation Medium
MCS-F	Macrophage colony stimulating factor
ox-LDL	oxidiertes LDL-Cholesterin
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standarddeviation
SPM	Schläge pro Minute
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM	vascular cell adhesion molecule

## **1. ZUSAMMENFASSUNG**

Nikotinkonsum steht in enger Relation zur Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen, welche hauptsächlich durch Atherosklerose bedingt sind. Weltweit führen atherosklerotisch bedingte Morbiditäten die Statistiken für Todesursachen an. In den letzten zwanzig Jahren wurde die Entstehung atherosklerotischer Plaques weitgehend aufgeklärt. Hierbei spielt die chronische Inflammation der Intima der Gefäßwände eine zentrale Rolle, zu welcher Monozyten substantiell beitragen. Innerhalb der Monozyten können drei unterschiedliche Subpopulationen voneinander abgegrenzt werden. Im Kontext der Atherogenese erscheint die als proinflammatorisch geltende Population der intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten von besonderer Bedeutung; bei vorhandener Atherosklerose - wie bei anderen inflammatorisch bedingten Erkrankungen - ist das Verhältnis der einzelnen Subpopulationen hin zu diesen intermediären Monozyten verschoben.

Da das Rauchen von Zigaretten nachweislich zu vermehrter Ausbildung atherosklerotischer Plaques an den Gefäßwänden führt und da die intermediären Monozyten in enger Relation zur Atherosklerose stehen, sollte die Hypothese überprüfen, dass Raucher im Gegensatz zu Nichtrauchern eine erhöhte Anzahl an intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten im peripheren Blut haben.

Diese Arbeit untersuchte daher Monozytensubpopulationen in Relation zum Raucherstatus bei 415 gesunden Probanden. Hierfür wurden bei allen Studienteilnehmern Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der Nikotinstatus und weitere kardiovaskulären Risikofaktoren wurden mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens aufgenommen und in Relation zu den einzelnen Monozytensubpopulationen und dem Entzündungsmarker CRP gesetzt. Zur Aufklärung pathophysiologischer Signalkaskaden wurde der Effekt von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, welche im Zigarettenrauch enthalten sind, auf Monozytenzellkulturen *in vitro* untersucht.

Die Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese nicht: Die Anzahl der Gesamtmonozyten war bei Nikotinkonsum erhöht, jedoch waren entgegen unseren Erwartungen im peripheren Blut von Rauchern nicht die proinflammatorischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten, sondern die klassischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten in erhöhter Anzahl

nachzuweisen. *In vitro* konnte erkannt werden, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe eine immunsupprimierende Wirkung aufweisen. Zum einen fördern diese Stoffe einen frühen Übergang unreifer Monozyten vom Knochenmark ins Blut, zum anderen ist die Rezeptorexpression der Monozyten heruntergesetzt.

## **SUMMARY**

Nicotine consumption is closely related to the prevalence of cardiovascular diseases, which are mainly caused by atherosclerosis. Atherosclerotic-related morbidities are statistically the leading causes of death worldwide. During the last twenty years, the development of atherosclerotic plaques has been largely elucidated. The chronic inflammation of the intima of the vessel walls plays a central role, where monocytes contribute to substantially. The monocytes can be differentiated into three subpopulations. Concerning atherogenesis the proinflammatory considered intermediate CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are significant; the ratio of the different subpopulations of monocytes tends to the intermediate monocytes in established atherosclerosis as well as in inflammatorily caused morbidities too.

As smoking cigarettes demonstrably leads to increased formation of atherosclerotic plaques on the artery walls and the intermediate monocytes are in close relation to atherosclerosis, our hypothesis should examine if smokers – in contrast to non smokers - have an increased number of intermediate CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in their peripheral blood.

This paper therefore analyzed monocyte subpopulations in relation to the smoking state of 415 healthy volunteers. For this the monocyte subpopulations of the subjects were examined by flow cytometry. In addition, the nicotine state and the cardiovascular risk factors of the subjects were recorded using a standardized questionnaire and set in relation to the individual monocyte subpopulations and the inflammatory marker CRP. To clarify the pathophysiological signal cascades, the effect of polycyclic hydrocarbons, which are present in cigarette smoke was investigated *in vitro* on monocyte cell cultures.

The results did not confirm our hypothesis: The number of total monocytes was increased in nicotine consumption, however, contrary to our expectations, not the proinflammatory CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes, but the classical CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes

were to be found in increased numbers in the peripheral blood of smokers. It could be demonstrated *in vitro* that polycyclic hydrocarbons have an immunosuppressive effect. On the one hand, these agents promote an early transition of immature monocytes from the bone marrow into the blood, on the other hand the receptor expression of monocytes is lowered.

## **RESUME**

La consommation de nicotine est liée proche à la prévalence de maladies cardiovasculaires qui sont dues principalement à l'athérosclérose. Les statistiques des causes de décès mondiales sont dominées par des maladies dues à l'athérosclérose. Le développement des plaques d'athérosclérose a été clarifié presque entièrement les derniers vingt ans. Au centre de ce développement se trouve l'inflammation chronique de l'intima de la paroi vasculaire dont les monocytes jouent un rôle crucial. Parmi les monocytes on peut différencier 3 sous-populations. Dans le contexte de l'athérogénèse la sous-population des monocytes intermédiaires CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, jugée comme proinflammatoire, paraît d'une grande importance ; en effet, en présence d'une athérosclérose manifeste – ainsi que chez d'autres maladies causées par une inflammation – la relation entre les différentes sous-populations de monocytes tend vers celle des intermédiaires.

Comme il est prouvé que fumer des cigarettes donne lieu à une majoration du développement de plaques d'athérosclérose au niveau de la paroi des vaisseaux et comme les monocytes intermédiaires s'impliquent dans l'athérosclérose, notre hypothèse devait investiguer si fumeurs ont plus de monocytes intermédiaires dans leur sang que les non-fumeurs.

Pour cette raison, ce travail faisait la recherche sur les sous-populations des monocytes en relation avec l'état fumeur de 415 volontiers de bonne santé. Pour ceci on examinait chez chaque sujet les sous-populations de monocytes par cytométrie en flux. L'état fumeur ainsi que d'autres risques cardiovasculaires ont été enregistrés par un questionnaire standardisé et posés en relation avec les sous-populations de monocytes et le marqueur d'inflammation CRP. Pour clarifier des cascades de signaux pathologiques on a examiné *in vitro* l'effet sur les monocytes des hydrocarbures

aromatiques polycycliques, qui sont présents en grand nombre dans la fumée des cigarettes.

Les résultats ne confirment pas notre hypothèse. Le nombre total des monocytes était élevé en cas de consommation de nicotine, par contre se montrait-il un nombre élevé des monocytes classiques CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> dans le sang des fumeurs et non des monocytes intermédiaires CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>. Le modèle in vitro nous montrait que les hydrocarbures aromatiques polycycliques possèdent un effet immunodépresseur. Ces molécules d'un côté accélèrent le passage de la moelle osseuse au sang de monocytes immatures, de l'autre côté ils font en sorte que l'expression de récepteurs sur la surface des monocytes soit diminuée.

## **2. EINLEITUNG**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache der westlichen Industrienationen. Infolge der weiterhin steigenden Inzidenz von Diabetes und Adipositas als zentrale kardiovaskuläre Risikofaktoren werden kardiovaskuläre Erkrankungen auch in den nächsten Jahrzehnten die Todesstatistiken der Industrieländer dominieren.

So ist auch in Deutschland jeder zweite Todesfall auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen. Ischämische Herzkrankheiten stehen hier an erster Stelle der Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland 2012).

Pathogenetisch liegt der ischämischen Herzerkrankung zumeist eine Atherosklerose der Koronararterien zugrunde.

### **2.1 Atherosklerose - eine chronisch inflammatorische Erkrankung**

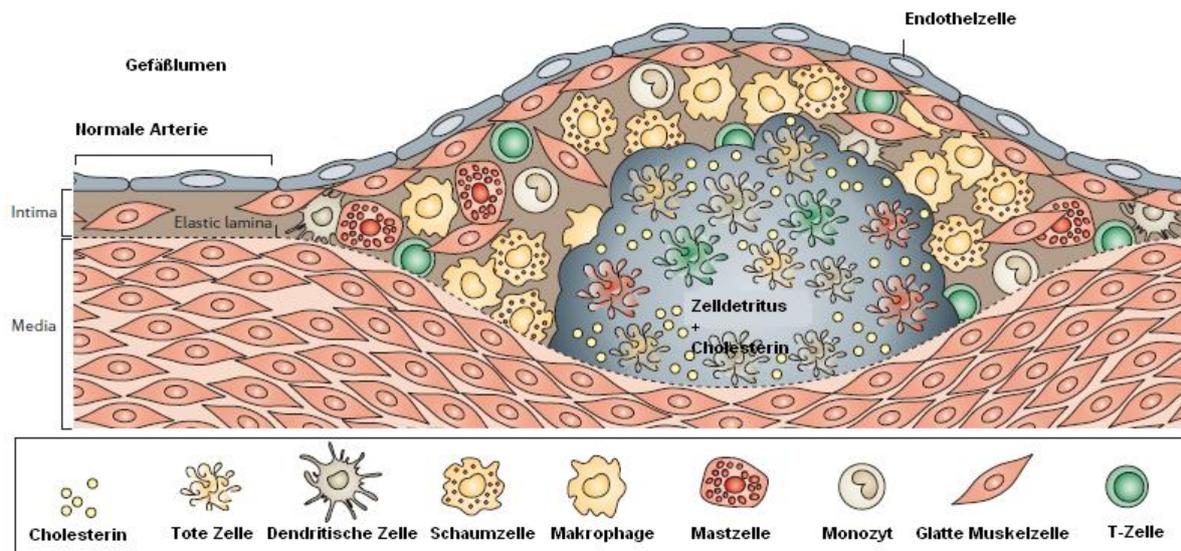
Die Atherosklerose ist eine vaskuläre Systemerkrankung, deren Initialläsionen sich abhängig von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Zigarettenrauchen) schon in der Kindheit manifestieren.

Ging man früher noch davon aus, dass Atherosklerose vor allem durch passive Fetteinlagerung in die Gefäßwände verursacht sei, so weiß man heute, dass es sich bei der Bildung von atherosklerotischen Plaques um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem die Inflammation eine führende Rolle spielt (Ross 1999; Hansson and Libby 2006; Hansson and Hermansson 2011). Innerhalb der Faktoren, welche die initiale atherosklerotische Entzündungskaskade auslösen, wird wiederum dem klassischen Risikofaktor Hypercholesterinämie eine zentrale Bedeutung beigemessen. Daher wird die Hypercholesterinämie heute zusammen mit der Inflammation als „Partner in crime“ der Atherogenese betrachtet (Steinberg 2002).

Frühe Stadien der Atherogenese werden durch Rekrutierung von LDL-Cholesterin in die Intima des Blutgefäßes initiiert (Hansson and Hermansson 2011). Eine Schlüsselreaktion bildet die chemische Bindung von ApoB100 der LDL-Cholesterin-Moleküle an Proteoglykane der Gefäßintima (Skalen, Gustafsson et al. 2002; Tabas,

Williams et al. 2007). Im Inneren der Gefäßwand kommt es anschließend zur Oxidation der akkumulierten LDL- Cholesterin-Moleküle (oxLDL) und weiterer vorhandener Lipide wie Triglyceride und Phospholipide. Bestimmte Komponenten des oxLDL wirken als biologisch aktive Moleküle und sind demgemäß verantwortlich für die Aktivierung der Gefäßendothelzellen, die daraufhin auf ihrer Oberfläche diverse Leukozyten-Adhäsionsmoleküle exprimieren. Das „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) steht hier bei der initialen Rekrutierung von Leukozyten wesentlich im Vordergrund (Cybulsky, Lichtman et al. 1999). Im Blut zirkulierende Monozyten und T-Zellen binden an die VCAM1-exprimierenden Endothelzellen und wandern unter Einfluss lokal gebildeter Chemokine in die Gefäßwand ein (Hansson and Libby 2006).

Hier kommt die zweite zentrale Komponente der Atherogenese zum Tragen: die Perpetuation der Entzündung durch Monozyten in der beginnenden atherosklerotischen Läsion. Nach Einwanderung der Monozyten in die Gefäßwand differenzieren diese unter dem Einfluss des lokal vorhandenen „macrophage colony-stimulating factor“ (MCS-F) in der Gefäßintima zu Makrophagen (Rajavashisth, Andalibi et al. 1990; Smith, Trogan et al. 1995), welche die für eine Plaque charakteristischen Schaumzellen bilden. Letztere erlangen ihren Namen aufgrund ihres typischen Aussehens; sie entstehen durch Phagozytose von oxLDL über die Scavenger-Rezeptoren (Rezeptoren, welche spezifisch oxidierte bzw. acetylierte LDL-Moleküle erkennen), so dass Cholesterinmoleküle intrazellulär akkumulieren. Makrophagen und Schaumzellen produzieren diverse proinflammatorische Mediatoren, welche weitere Monozyten und T-Zellen aus dem Gefäßlumen in die entstehende Läsion anlocken, die daraufhin ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  produzieren (Jonasson, Holm et al. 1986; Hansson and Libby 2006). Diese inflammatorischen Chemokine unterhalten einen entzündlichen Circulus vitiosus der Atherosklerose, indem sie ihrerseits Endothelzellen und Makrophagen aktivieren und zur Produktion weiterer Entzündungsmediatoren und Expression von Adhäsionsmolekülen anregen (Hansson, Robertson et al. 2006).



**Abbildung 1 – Zelluläre Zusammensetzung einer atherosklerotischen Plaque**

## 2.2 Monozytensubpopulationen und Atherosklerose

Aufgrund dieses pathophysiologischen Verständnisses wird den Monozyten eine bedeutende Rolle in der Atherogenese zugeschrieben. Diese Annahme wird durch klinische Studien unterstützt, die Assoziationen zwischen der Anzahl der Monozyten im Blut einerseits mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie erhöhtem BMI und erhöhten Triglyceriden, andererseits mit prävalenter subklinischer Atherosklerose gesehen haben (Chapman, Beilby et al. 2004; Nasir, Guallar et al. 2005; Waterhouse, Cahill et al. 2008).

Allerdings wurden in den meisten experimentellen und klinischen Arbeiten humane Monozyten als homogene Zellpopulation betrachtet. In den letzten Jahren wurde jedoch wiederholt von unserer (Heine, Ulrich et al. 2008; Heine, Ortiz et al. 2012) und von anderen Arbeitsgruppen (Nasir, Guallar et al. 2005; Kocaman, Sahinarslan et al. 2011) postuliert, dass eine Betrachtung der Monozytenheterogenität für das Verständnis der Atherogenese beim Menschen von essentieller Bedeutung sein könnte.

Monozyten lassen sich klassischerweise mittels Immunfluoreszenz anhand ihrer Expression des LPS-Rezeptors CD14 identifizieren. In den frühen 1980er Jahren wurde erstmals über unterschiedliche Funktionen und Phänotypen der Monozyten berichtet

(Norris, Morris et al. 1979; Yasaka, Mantich et al. 1981; Auffray, Sieweke et al. 2009; Saha and Geissmann 2011). Im Jahre 1989 berichteten Passlick, Flieger und Ziegler-Heitbrock erstmals über eine Monozytensubpopulation, welche durch die Koexpression von CD14 und CD16 (Immunglobulin G Fc-γ III Rezeptor) charakterisiert ist, und die sich daher von den übrigen humanen Monozyten, welche CD14, jedoch kein CD16 exprimieren, differenzieren lässt (Passlick, Flieger et al. 1989).

Nachdem über zwei Jahrzehnte keine einheitliche Benennung der Monozytensubpopulationen in der wissenschaftlichen Literatur existierte, wurde 2010 in Zusammenarbeit mit dem Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Sciences eine einheitliche Nomenklatur der Monozyten definiert (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010). Aktuell werden die Monozyten unterteilt in:

Klassische CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> Monozyten

Intermediäre CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> Monozyten

Nicht klassische CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> Monozyten

Bei gesunden Individuen repräsentieren die klassischen CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> Monozyten über 80% und die CD16-positiven Monozyten zusammen 10-20% der im Blut zirkulierenden Monozyten (Rogacev and Heine 2010).

Wenn nicht zwischen intermediären und nicht klassischen Monozyten differenziert wird, empfiehlt das Nomenclature Committee den Term „CD16-positive Monozyten“, sofern CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> gleichzeitig betrachtet werden.

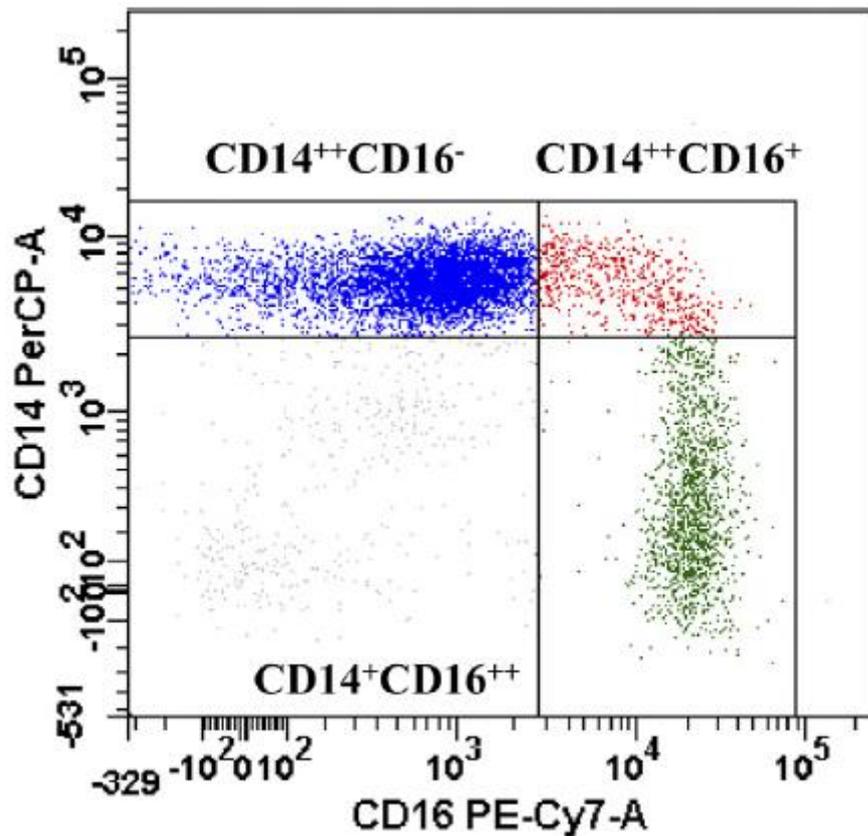


Abbildung 2 – Durchflusszytometrische Untersuchung von Monozytensubpopulationen

### 2.2.1 CD16-positive Monozyten

Die CD16-positiven Monozyten werden zumeist als proinflammatorisch betrachtet (Saha and Geissmann 2011). Generell schreibt man dieser Subpopulation eine erhöhte Migrations- und Adhäsionskapazität, sowie eine verstärkte Antigenpräsentierung zu (Passlick, Flieger et al. 1989; Ancuta, Moses et al. 2004; Merino, Buendia et al. 2011; Poitou, Dalmas et al. 2011).

Weitere Argumente, welche für den inflammatorischen Charakter dieser Subpopulation sprechen, sind die Sekretion von Entzündungsmediatoren und ihre Relation in Bezug auf inflammatorische Erkrankungen:

So ist bekannt, dass die CD16-positiven Monozyten im Gegensatz zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten vermehrt den Entzündungsmediator TNF- $\alpha$  und dafür weniger anti-inflammatorisches Interleukin-10 ausschütten (Belge, Dayyani et al. 2002; Schlitt, Heine et al. 2004; Poitou, Dalmas et al. 2011). TNF- $\alpha$  steuert unter anderem die Immunantwort

über Regulation der Zellproliferation, der Zellmigration und der Rezeptorexpression (Belge, Dayyani et al. 2002).

In klinischen Arbeiten korreliert die Anzahl der CD16-positiven Monozyten mit den Entzündungsmarkern CRP und Blutsenkungsgeschwindigkeit (Ziegler-Heitbrock 2007). Weiterhin werden erhöhte Zellzahlen der CD16-positiven Monozyten bei diversen Infektionskrankheiten beobachtet wie HIV (Thieblemont, Weiss et al. 1995; Crowe, Westhorpe et al. 2010), Tuberkulose (Vanham, Edmonds et al. 1996), Erysipel (Horelt, Belge et al. 2002) und Leishmaniose (Soares, Barral et al. 2006). Im Falle einer bakteriell induzierten Sepsis kann die Anzahl der CD16-positiven Monozyten die Anzahl der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten übersteigen (Fingerle, Pforte et al. 1993). Auch Autoimmunerkrankungen korrelieren positiv mit erhöhter Anzahl CD16-positiver Monozyten. Dies gilt vor allem für die aktive rheumatoide Arthritis (Kawanaka, Yamamura et al. 2002) und den aktiven Systemischen Lupus erythematoses (Hepburn, Mason et al. 2004). Schließlich ist die Tatsache, dass unter immunsuppressiver Glucocorticoidtherapie die Zahl der CD16-positiven Monozyten sinkt, ein weiterer Hinweis auf ihren Bezug zum Entzündungsgeschehen (Fingerle-Rowson, Angstwurm et al. 1998; Dayyani, Belge et al. 2003).

Nachdem die Bedeutung der Monozytenheterogenität zunächst bei klassischen inflammatorischen Erkrankungen untersucht wurde, rückte in den letzten Jahren die Bedeutung der CD16-positiven Monozyten bei Zivilisationserkrankungen wie Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen in den Vordergrund, zumal auch die Atherosklerose als chronisch-inflammatorische Erkrankung charakterisiert wurde (Cottam, Schaefer et al. 2002; Schlitt, Heine et al. 2004). Eine Zunahme von CD16<sup>+</sup> Monozyten bei koronarer Herzerkrankung wurde erstmals von Schlitt et al. 2004 berichtet. Die I LIKE HOME Studie unserer Arbeitsgruppe konnte darauffolgend eine signifikante Erhöhung spezifisch der CD16<sup>+</sup> Monozyten bereits bei subklinischer Atherosklerose nachweisen (Rogacev, Ulrich et al. 2010).

### **2.2.2 Die CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> Monozytenpopulation**

Bei Differenzierung der CD16-positiven Monozyten in intermediäre CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> und nichtklassische CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Zellen, erscheinen intermediäre CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten

besonders proatherogen:

So exprimieren CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> Monozyten gegenüber den klassischen und den nicht klassischen Monozyten (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> - resp. CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> Monozyten) vermehrt den CCR5-Rezeptor (Ancuta, Rao et al. 2003; Rogacev, Seiler et al. 2011). Der CCR5-Rezeptor hat eine wesentliche Funktion bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques (Zernecke, Liehn et al. 2006; Braunersreuther, Zernecke et al. 2007; Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008).

Hinzu kommt eine vermehrte Expression des Angiotensin converting enzyme (ACE), welche an Gefäßläsionen einen möglichen proatherogenetischen Effekt durch Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit potentiell resultierender Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und endothelialer Dysfunktion initiiert (Ulrich, Heine et al. 2006).

Von besonderer Bedeutung erscheint, dass klinisch-epidemiologische Studien bei Dialysepatienten und bei chronisch niereninsuffizienten Patienten erhöhte CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozytenzahlen als unabhängige Prädiktoren kardiovaskulärer Ereignisse erkannten (Heine, Ulrich et al. 2008; Rogacev, Seiler et al. 2011).

Aufgrund dieser potentiell prominenten Rolle von CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten in der humanen Atherogenese erscheint eine weitere Charakterisierung dieser Zellpopulation erforderlich. Insbesondere müssen Einflussfaktoren untersucht werden, welche die Zellzahl dieser Monozytensubpopulation beim Menschen beeinflussen. Während Zusammenhänge zwischen Adipositas und Hypercholesterinämie auf die Monozytenheterogenität wiederholt untersucht wurden (Rogacev, Ulrich et al. 2010; Poitou, Dalmas et al. 2011), sind Interaktionen zwischen Nikotinkonsum und Monozytenheterogenität kaum untersucht.

### **2.3 Nikotinkonsum und Atherosklerose**

Rauchen gehört zu den führenden kardiovaskulären Risikofaktoren. Eine Vielfalt epidemiologischer Studien hat gezeigt, dass das Zigarettenrauchen zusammen mit weiteren Risikofaktoren die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigt und damit zur Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt (Harats, Ben-Naim et al. 1989; Scheffler, Wiest et al. 1992; Rudolph, Rudolph et al. 2008).

Rauchen ist einerseits mit anderen klassischen Risikofaktoren assoziiert – vor allem Bluthochdruck (Tachmes, Fernandez et al. 1978) und erhöhtem LDL-Cholesterin (Craig, Palomaki et al. 1989) – andererseits jedoch bewirkt Nikotinabusus direkt eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen in der Gefäßwand, wodurch es zur vermehrten Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten kommt (Kalra, Ying et al. 1994; Shen, Rattan et al. 1996; Blann, Steele et al. 1997). Darüber hinaus führt der Zigarettenrauch zur Aktivierung von Immunzellen mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (vor allem TNF- $\alpha$ ), welche in der Gefäßwand ein Entzündungsmilieu etablieren, das zur Entstehung und Progredienz atherogenetischer Plaques beitragen könnte (Lau, Li et al. 2006; Csiszar, Podlutzky et al. 2009).

Bisher ist unbekannt, ob Nikotinkonsum zusätzliche proinflammatorische Effekte aufweist, indem dieser die Monozytenheterogenität beeinflusst. In unserer I LIKE HOME Studie sollten deshalb Zusammenhänge zwischen Nikotinkonsum und Monozytensubpopulationen in einer großen Kohorte gesunder Probanden untersucht werden.

In diesem Zusammenhang wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Raucher besitzen im Gegensatz zu Nichtrauchern eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten im Blut.

## **3. MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Klinischer Teil**

#### ***3.1.1 Studiendesign***

##### ***I LIKE HOME I***

Unsere initiale I LIKE HOME Studie („Inflammation, Lipoprotein Metabolism and Kidney Damage in early atherogenesis - The Homburg Evaluation“) wurde zwischen 2004 und 2005 in Kooperation der Klinik für Innere Medizin IV - Nieren- und Hochdruckkrankheiten, dem Betriebsärztlichen Dienst der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes - Schwerpunkte: Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin - und dem Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes initiiert. Hierbei wurden 622 Probanden rekrutiert. Die Mehrzahl der Probanden waren Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes, welche einen elektiven Vorstellungstermin beim Betriebsärztlichen Dienst erhielten und im Rahmen dieses Termins zur Studienteilnahme eingeladen wurden. Neben den Mitarbeitern des Universitätsklinikums des Saarlandes wurden Mitarbeiter anderer Unternehmen in Homburg und Medizinstudenten der Universität des Saarlandes rekrutiert.

##### **Einschlusskriterien**

- Gesunde Personen im Alter zwischen 25 und 60 Jahren
- Einwilligung nach Aufklärung

##### **Ausschlusskriterien**

- Nicht komplett saniertes Malignom
- Akute oder chronische fieberhafte Infektion
- Immunsuppressive Therapie aufgrund einer Autoimmunerkrankung
- Manifeste koronare Herzkrankheit (stattgefundener Herzinfarkt, Koronarintervention oder Aortokoronare Bypass-Operation)
- Zerebrovaskuläre Erkrankungen (stattgefundener Apoplex, Carotisoperation oder Carotisintervention)
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit (stattgefundene nicht-traumatische

Amputation, Intervention der Becken-Bein-Arterien, periphere Bypass-Operation)

- Eingeschränkte Nierenfunktion definiert als  $GFR \leq 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$

Eine detaillierte Darstellung der I LIKE HOME I Studie erfolgte in einer früheren Publikation (Rogacev, Ulrich et al. 2010).

Die vorgelegte Dissertationsschrift stellt Ergebnisse der Nachfolgeuntersuchung dar, welche im Jahr 2010 initiiert wurde.

### ***I LIKE HOME II***

Alle Studienteilnehmer der I LIKE HOME I Studie (I LIKE HOME I) wurden fünf Jahre nach initialer Studienteilnahme – somit zwischen April 2009 und April 2011 – zu einer Follow-up Untersuchung eingeladen.

Während 12 Monaten erfolgte die Erhebung klinischer und immunologischer Daten durch das I LIKE HOME II Studienteam.

Von den initial 622 Probanden der I LIKE HOME I Studie konnten 417 Probanden für die Teilnahme an der I LIKE HOME II Studie rekrutiert werden. Die meisten übrigen Probanden der I LIKE HOME I waren nicht länger am Universitätsklinikum des Saarlandes tätig; in der Mehrzahl war der aktuelle Arbeitsplatz resp. Wohnort nicht bekannt, so dass keine Kontaktaufnahme möglich war.

Die Probanden wurden telefonisch zur Studienteilnahme eingeladen. Bei allen Probanden erfolgte eine standardisierte Blutentnahme im nüchternen Zustand.

Es erfolgte nachfolgend eine Messung des arteriellen Blutdruckes sowie eine standardisierte Erfassung von kardiovaskulären Risikofaktoren, Co-Morbidität und aktueller Medikation mittels eines Fragebogens in enger Anlehnung an die I LIKE HOME I Studie.

Die I LIKE HOME I - und die I LIKE HOME II Studien wurden durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

### **3.1.2 Studienablauf**

Die Studie wurde wie folgt durchgeführt:

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurde mit den Probanden am Untersuchungstermin ein Fragebogen durchgeführt und nach fünfminütiger Ruhepause mittels automatischem oszillometrischen Messgerät der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

Anschließend wurde den Probanden Blut entnommen, welches im immunologischen Labor der Inneren Medizin IV am Universitätsklinikum des Saarlandes weiterverarbeitet wurde. Im Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes wurden zusätzlich klinisch-chemische Werte aus den Blutproben bestimmt.

#### Definition der kardiovaskulären Risikofaktoren

Als Diabetiker wurden diejenigen Probanden definiert, die einen Nüchternblutzucker über 126 mg/dl aufwiesen oder in der Eigenanamnese einen prävalenten Diabetes mellitus und / oder die Einnahme von blutzuckersenkenden Medikamenten berichteten.

Die Probanden wurden auch über ihren Nikotinkonsum befragt; als „aktive Raucher“ wurden die Probanden klassifiziert, welche in den letzten 28 Tagen vor Studienrekrutierung mindestens eine Zigarette geraucht hatten.

Der Body-Mass-Index (BMI) wurde aus dem Quotienten von Körpergewicht (kg) und dem Quadrat der Körpergröße (m<sup>2</sup>) errechnet.

$$\text{BMI} = \text{Gewicht (kg)} / \text{Körpergröße (m}^2\text{)}$$

### **3.1.3 Datenanalyse**

Die elektronische Datenerfassung erfolgte mittels Microsoft® Excell. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten dann in die Statistik Software SPSS (Statistical Product and Service Solutions) Version 15.0 übertragen.

Alle stetigen Merkmale sind als Mittelwert ± Standardabweichung aufgeführt. Da für das Merkmal des Entzündungsmarkers CRP keine Normalverteilung vorlag, ist dieser Wert als Median (Interquartilsabstand) dargestellt.

Alle stetigen Merkmale sind mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und die Korrelationskoeffizienten sind mittels Kendall-Tau-b berechnet. Die Bewertung der

Korrelationskoeffizienten wurde auf  $0 - 0,15 =$  schwach,  $0,15 - 0,20 =$  mittel und  $> 0,20 =$  stark festgelegt.

Die Verfasserin dieser Dissertation führte mit Unterstützung des Betreuers und der Labor-Mitarbeiter die immunologischen Untersuchungen aller Probanden, die zwischen April 2010 und Februar 2011 in die I LIKE HOME II Studie eingeschlossen wurden, selbstständig durch. Die immunologischen Untersuchungen der übrigen Probanden erfolgte durch eine Medizinisch-Technische Assistentin. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer und die Erhebung der klinischen Daten erfolgte im Rahmen gesonderter Dissertationsarbeiten.

Die statistische Auswertung der immunologischen Daten erfolgte durch die Verfasserin dieser Dissertation gemeinsam mit dem Betreuer der Promotionsarbeit.

Weiterhin führte die Verfasserin dieser Dissertationsschrift für die Längsstudie die Rekrutierung der 12 Probanden, die klinische Untersuchung und die immunologischen Untersuchungen selbstständig durch.

## **3.2 Experimenteller Teil**

### ***3.2.1 Immunphänotypisierung der Monozytensubpopulationen***

Die Färbung der Monozytensubpopulationen erfolgte nach der etablierten Standardmethode des immunologischen Labors der Klinik für Innere Medizin IV. Hierfür wurden spezifische Zelloberflächenantigene der Monozyten mit Hilfe fluorchromkonjugierter monoklonaler Antikörper markiert und durchflusszytometrisch detektiert.

Aus jeder Blutprobe wurden 100 µl EDTA-Vollblut in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben, das Gemisch gevortext und für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Färbung des Pellets unter der Sterilbank angesetzt.

In der I LIKE HOME II – Studie wurden zum einen CD86 als panmonozytärer Marker und zum anderen CD14 und CD16 zur Differenzierung der Monozytensubpopulationen gefärbt. Benutze Antikörper und Menge siehe Tabelle 4.

Nach dem Pipettieren der benötigten Antikörpermenge wurde die Mischung auf insgesamt 70 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Zur Lyse der Erythrozyten wurden der Probe 2 ml Lysing-Solution hinzugefügt und der Ansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen.

Anschließend wurde die Probe für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, gevortext und wieder wie oben zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl 1%igem PFA fixiert, gevortext und im Durchflusszytometer gemessen.

### ***3.2.2 In vitro Generierung hämatopoetischer CD34<sup>+</sup> Stammzellen***

Zur Isolierung von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen wurde bei freiwilligen Probanden Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen und die darin enthaltenen peripheren Monozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll-Paque isoliert.

Die Isolierung von CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte mit dem CD34 MicroBead Kit nach Anleitung des Herstellers. Die durchschnittliche Reinheit der isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und lag bei  $80,4 \pm 6,4$  %. Hierbei wurden die Zellen mittels Antikörpern gegen CD34 und CD45 markiert.

Nachfolgend wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen zunächst 13 Tage auf 6-Well Zellkulturplatten in mit Zytokinen (TPO, SCF, flt3-Ligand und IL-3) angereichertem Stammzell-Wachstumsmedium ausgebreitet. Während dieser Zeit konnte eine 25fache Vermehrung der hämatopoetischen Stammzellen beobachtet werden. Im zweiten Schritt wurden die vermehrten Zellen ( $2 \times 10^4$  Zellen/ml) in 6-Well Zellkulturplatten und in Stammzell-Wachstumsmedium eingesetzt.

Die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu Monozyten wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen nach Markierung der Oberflächenrezeptoren CD86, CD14 und CD16 beobachtet. Die Monozyten wurden dann nach der Verteilung ihrer Rezeptoren in drei Subgruppen CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> eingeteilt. Der Einfluss von Benzo(a)pyren und  $\alpha$ -Naphthoflavon auf die Stammzellen wurde untersucht indem diese Chemikalien dem Stammzell-Wachstumsmedium (10 µM Benzo(a)pyren und 20 µM  $\alpha$ -Naphthoflavon) hinzugefügt wurden.

### 3.3 Material

#### 3.3.1 Substanzen und Medien

Tabelle 1 - Substanzen und Medien

Substanz oder Medium	Bezugsquelle
Aqua dest.	Braun, Melsungen, D
BD FACS Lysing Solution (10fach)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS-Flow	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PBS 1x (ohne Ca <sup>2+</sup> u. Mg <sup>2+</sup> )	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Lymphocyte LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Paraformaldehyd 95% (PFA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, D
DNA -Marker 1kb	Fermentas, St. Leon-Rot, D
6-fach DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
5-(und 6)-Carboxy-2', 7'- dihydrofluorescein Diacetat (H <sub>2</sub> DFFDA)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Rainbow-Partikel	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, D

### 3.3.2 Chemikalien

Tabelle 2 - Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Peqlab, Erlangen, D
Borsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethylen-diamin-tetra-essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, D
NaN <sub>3</sub>	Serva, Heidelberg, D
Benzo(a)pyren α-Naphthoflavon	Sigma Aldrich, München, D

### 3.3.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3 - Lösungen und Puffer

Lösung oder Puffer	Ingredienz	Menge
FACS-Puffer	BSA	2,5 mg
	NaN <sub>3</sub> , 10%	3,5 ml
	PBS	500 ml
	FCS	25 ml
Lysing Solution	BD-Lysing Solution 10-fach	50 ml
	Aqua dest.	450 ml
NaN <sub>3</sub> 10%	NaN <sub>3</sub>	10 g
	PBS	100 ml

PFA 4% (pH 7,4 – 7,6)	PFA	8 g
	PBS	200 ml
	Lösen im Wasserbad bei pH-Wert von 7,4 – 7,6	
PFA 1%	PFA 4%	25 ml
	PBS	75 ml
TBE-Laufpuffer (5x)	Tris-Base	54 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M)	20 ml
	Aqua dest.	1 L
TBE-Laufpuffer (1x)	TBE-Laufpuffer (5x)	200 ml
	Aqua dest.	800 ml
PBS 1x (ohne Ca <sup>2+</sup> u. Mg <sup>2+</sup> ) + EDTA (5M)	PBS EDTA	500 ml

### 3.3.4 Antikörper

Tabelle 4 - Antikörper

Antikörper	Konjugat	Firma	Menge
anti-CD86	PE	Beckmann Coulter, Krefeld, D	5 µl
anti-CD14	PERCP	BD Biosciences, Heidelberg, D	4 µl
anti-CD16	PE-CY7	BD Biosciences, Heidelberg, D	0,5 µl

anti-CD34	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D	20 µl
anti-CD45	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D	20 µl

### 3.3.5 Kits

Tabelle 5 - Kits

Kits	Firma
CD34 Microbead Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

### 3.3.6 Geräte

Tabelle 6 - Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
Eisflockenmaschine (Scotsman)	Tepa, Barsbüttel, D
Eppendorffzentrifuge 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
Sterile Werkbank Laminair HB2472	Heraeus Instruments, Hanau, D
Vortex Mixer K	neoLab, Heidelberg, D
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

### 3.3.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 - Verbrauchsmaterial

15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
50ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Einmal-Plastikpipetten	Cornig Costar, Wiesbaden, D
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	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
Sheath Fluid	Dako Cytomation, Hamburg, D
Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium DXF	Promo Cell, Heidelberg, D
Hematopoetic Progenitor Medium mit Cytokine Mix E (TPO,SCF, flt3-Ligand, IL-3)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
Thermo Scientific Nunclon™ MultiWell, Zellkulturplatte, 6 Well	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Allgemeine Charakteristika**

#### ***4.1.1 Baseline Charakteristika des Studienkollektivs***

Insgesamt konnten 417 Teilnehmer in die I LikeHOME II- Studie eingeschlossen werden. Die immunologische Auswertung der erhobenen Datensätze erfolgte bei 415 Probanden, bei zwei Probanden misslang die durchflusszytometrische Auswertung aus technischen Gründen.

Unter den Studienteilnehmern befanden sich 67,1% Frauen (N=280) und 5,3% Diabetiker (N=22). 21,3% (N=89) der Probanden erhielten eine antihypertensive Therapie. Tabelle 8 fasst weitere Charakteristika der I LIKE HOME II Kohorte zusammen.

**Tabelle 8 - Charakteristika der I LIKE HOME II Studienkohorte. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum (SPM: Schläge pro Minute; BMI: Body Mass Index)**

	MW	SD	Minimum	Maximum
Alter (Jahre)	49	7	30	65
Gewicht (kg)	77	17	40	177
Größe (cm)	170	9	148	202
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27	5	16	63
Herzfrequenz (SPM)	73	11	47	110
Systolischer Blutdruck	137	18	97	198
Diastolischer Blutdruck	89	11	61	137
Kreatinin (mg/dl)	0.8	0.2	0.5	1.5
Blutzucker (mg/dl)	97	16	66	224
Gesamtcholesterin (mg/dl)	215	37	122	344
LDL - Cholesterin (mg/dl)	134	35	61	270
HDL - Cholesterin (mg/dl)	64	17	25	127
Triglyceride (mg/dl)	114	67	30	635

#### 4.1.2 Baseline Charakteristika bei Rauchern und Nichtrauchern

26,4 % (N=110) der Studienteilnehmer waren aktive Raucher. Tabelle 9 vergleicht Raucher und Nichtraucher hinsichtlich anthropometrischer Charakteristika und kardiovaskulärer Risikofaktoren.

**Tabelle 9 - Anthropometrische Messparameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Rauchern und Nicht-Rauchern. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (CRP: Median [IQR]; CRP: C-reaktives Protein; SPM: Schläge pro Minute; BMI: Body Mass Index).**

	Raucher	Nichtraucher	p
Alter (Jahre)	49 $\pm$ 8	48 $\pm$ 7	0,869
Gewicht (kg)	75 $\pm$ 19	77 $\pm$ 17	0,242
Größe (cm)	169 $\pm$ 9	170 $\pm$ 9	0,877
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 $\pm$ 6	27 $\pm$ 5	0,104
Herzfrequenz (SPM)	74 $\pm$ 11	72 $\pm$ 11	0,245
Systolischer Blutdruck (mmHg)	137 $\pm$ 20	138 $\pm$ 17	0,350
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	88 $\pm$ 12	90 $\pm$ 11	0,202
Kreatinin (mg/dl)	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	0,172
Blutzucker (mg/dl)	96 $\pm$ 20	97 $\pm$ 15	0,116
CRP (mg/l)	1,6 [0,7; 3,3]	1,2 [0,6;2,6]	0,223
Gesamtcholesterin (mg/dl)	215 $\pm$ 33	215 $\pm$ 39	0,916
LDL - Cholesterin (mg/dl)	135 $\pm$ 34	134 $\pm$ 36	0,707
HDL - Cholesterin (mg/dl)	62 $\pm$ 18	64 $\pm$ 17	0,265
Triglyceride (mg/dl)	120 $\pm$ 82	111 $\pm$ 61	0,712

Raucher unterschieden sich von Nichtrauchern weder im Alter, noch in den erfassten kardiovaskulären Risikofaktoren.

So zeigten die Teilnehmer in beiden Gruppen im Mittel ein leichtes Übergewicht mit einem BMI von 26  $\pm$  6 kg/m<sup>2</sup> bei Rauchern und 27  $\pm$  5 kg/m<sup>2</sup> bei Nichtrauchern.

Weiterhin unterschieden sich weder der systolische, noch der diastolische Blutdruck zwischen Rauchern und Nichtrauchern signifikant; die Mittelwerte lagen im Bereich eines hoch normalen Blutdrucks.

Schließlich zeigte sich auch bei Lipid- und Blutzuckerwerten kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen.

## 4.2 Monozytensubpopulationen

### 4.2.1 Monozytensubpopulationen des Studienkollektivs

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Leukozytensubpopulationen des Studienkollektivs.

**Tabelle 10 - Zellzahlen der Leukozyten und Leukozytensubpopulationen bei den I LIKE HOME II Studienteilnehmern. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.**

	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Leukozyten / $\mu\text{l}$	6142	1784	1600	15500
Neutrophile Granulozyten / $\mu\text{l}$	3514	1411	848	12090
Lymphozyten / $\mu\text{l}$	1930	555	560	4264
Monozyten / $\mu\text{l}$	487	167	128	1386
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> Monozyten / $\mu\text{l}$	411	150	78	1261
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten / $\mu\text{l}$	27	16	8	128
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> Monozyten / $\mu\text{l}$	49	24	10	137
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> Monozyten (%)	84,1	5,7	58,8	94,9
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten (%)	5,6	2,3	1,8	18,6
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> Monozyten (%)	10,3	4,5	1,9	24,4

#### 4.2.2 Monozytensubpopulationen und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Assoziationen zwischen Zellzahlen der Monozyten(subpopulationen) und kardiovaskulären Risikofaktoren sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11 - Korrelationen von Zellzahlen der Monozyten(subpopulationen) mit anthropometrischen Messvariablen und kardiovaskulären Risikofaktoren (BMI: Body Mass Index; eGFR: geschätzte [estimated] glomeruläre Filtrationsrate. Angegeben sind Korrelationskoeffizienten (r) und ihr Signifikanzniveau (p).**

	<u>Gesamtmonozyten</u>		<u>CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten</u>		<u>CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten</u>		<u>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten</u>	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Alter	0,014	0,670	- 0,017	0,610	0,071	0,030	0,130	< 0,001
Gewicht	0,094	0,005	0,056	0,092	0,094	0,004	0,221	< 0,001
Größe	0,043	0,195	0,035	0,291	0,004	0,914	0,085	0,012
BMI	0,091	0,006	0,051	0,119	0,113	0,001	0,220	< 0,001
Herzfrequenz	0,047	0,157	0,052	0,120	0,083	0,013	0,010	0,761
Systolischer Blutdruck	0,087	0,009	0,059	0,073	0,094	0,005	0,171	< 0,001
Diastolischer Blutdruck	0,046	0,169	0,020	0,539	0,091	0,006	0,151	< 0,001
eGFR	0,083	0,011	0,090	0,006	0,039	0,231	0,034	0,296
Kreatinin	- 0,048	0,183	- 0,061	0,088	- 0,040	0,270	0,029	0,414
CRP	0,158	< 0,001	0,134	< 0,001	0,165	< 0,001	0,162	< 0,001
Gesamtcholesterin	- 0,036	0,278	- 0,037	0,265	- 0,014	0,674	-0,008	0,818
LDL-Cholesterin	- 0,036	0,279	- 0,041	0,218	0,006	0,856	0,001	0,968
HDL-Cholesterin	- 0,076	0,022	- 0,066	0,045	- 0,069	0,037	- 0,072	0,031
Triglyceride	0,107	0,001	0,094	0,004	0,068	0,039	0,112	0,001

Eine positive Korrelation mit dem BMI zeigt sich bei den Zellzahlen beider CD16-positiven Monozytensubpopulationen. Die Zellzahlen der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten korrelieren schwach (r = 0,113; p = 0,001), die Zellzahlen der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten stärker (r = 0,220; p < 0,001) mit dem BMI.

Weiterhin korrelieren die Zellzahlen der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten mit den systolischen

und diastolischen Blutdruckwerten ( $r = 0,171$ ;  $p < 0,001$  resp.  $r = 0,151$ ;  $p < 0,001$ ). Hingegen weisen die Zellzahlen weder der Gesamtmonozyten, noch einer der drei Subpopulationen, einen relevanten Zusammenhang mit LDL-Cholesterin oder HDL-Cholesterin auf. Eine schwache positive Korrelation der Zellzahlen der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten besteht mit den Plasma-Triglyceriden ( $r = 0,112$ ;  $p = 0,001$ ).

Somit erwiesen sich die Zellzahlen der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten als diejenige Monozytensubpopulation, welche am deutlichsten mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert war.

#### ***4.2.3 Monozytensubpopulationen und andere systemische Entzündungsmarker***

Die Zellzahlen sowohl der Gesamtmonozyten ( $r = 0,158$ ;  $p < 0,001$ ) als auch der drei Subpopulationen korrelieren positiv mit dem systemischen Inflammationsmarker CRP.

### 4.3 Zusammenhang zwischen Rauchen und Monozytensubpopulationen

Tabelle 12 vergleicht die Raucher und Nichtraucher hinsichtlich der Zellzahlen von Leukozyten und ihrer Subpopulationen.

**Tabelle 12 - Zellzahlen der Leukozyten(subpopulationen) bei Rauchern und Nichtrauchern. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung sowie das Signifikanzniveau (p).**

	<u>Raucher</u>	<u>Nichtraucher</u>	<u>p</u>
Leukozyten / $\mu$ l	7187 $\pm$ 2081	5767 $\pm$ 1501	< 0,001
Neutrophile Granulozyten / $\mu$ l	4223 $\pm$ 1705	3260 $\pm$ 1193	< 0,001
Lymphozyten / $\mu$ l	2175 $\pm$ 590	1842 $\pm$ 515	< 0,001
Monozyten / $\mu$ l	569 $\pm$ 208	457 $\pm$ 139	< 0,001
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> Monozyten / $\mu$ l	495 $\pm$ 186	380 $\pm$ 121	< 0,001
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten / $\mu$ l	30 $\pm$ 20	26 $\pm$ 15	0,128
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> Monozyten / $\mu$ l	44 $\pm$ 25	50 $\pm$ 24	0,003
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> Monozyten (%)	86,9 $\pm$ 5,2	83,1 $\pm$ 5,6	< 0,001
CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten (%)	5,2 $\pm$ 2,3	5,7 $\pm$ 2,3	0,006
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> Monozyten (%)	7,9 $\pm$ 3,9	11,2 $\pm$ 4,4	< 0,001

Raucher haben höhere Leukozytenzahlen im peripheren Blut als Nichtraucher (p < 0,001; Abb.3). Des Weiteren weisen Raucher auch mehr neutrophile Granulozyten und Lymphozyten auf als Nichtraucher (p < 0,001).

Bei den Gesamtmonozyten weisen Raucher erneut höhere Zellzahlen auf (Abb. 4).

Betrachtet man die Zellzahlen der Monozytensubpopulationen, so weisen Raucher mehr CD16<sup>++</sup>CD14<sup>-</sup> Monozyten auf als Nichtraucher (p < 0,001; Abb. 5), während Nichtraucher mehr CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten aufzeigen (p = 0,003; Abb. 7). Die Zellzahl der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unterscheidet sich nicht signifikant (p = 0,128; Abb. 6).

Bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der einzelnen Monozytensubpopulationen weisen Raucher höhere Anteile der CD16<sup>-</sup> Monozyten (p < 0,001), Nichtraucher jedoch höhere Anteile der CD16-positiven Monozyten auf (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten: p = 0,006 / CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten: p < 0,001).

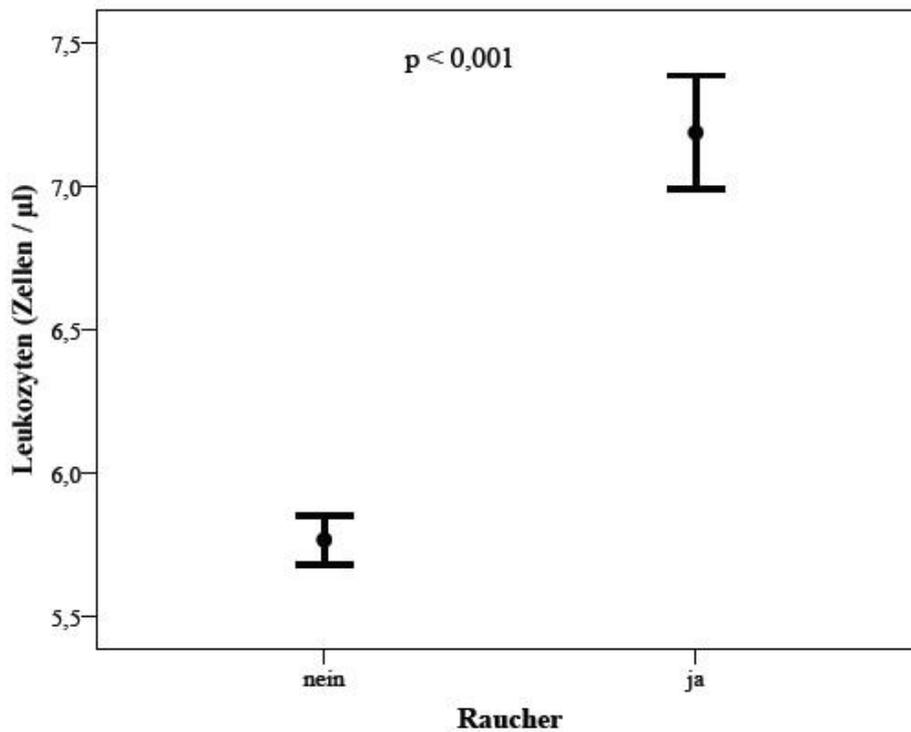


Abbildung 3 - Leukozytenzahl bei Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

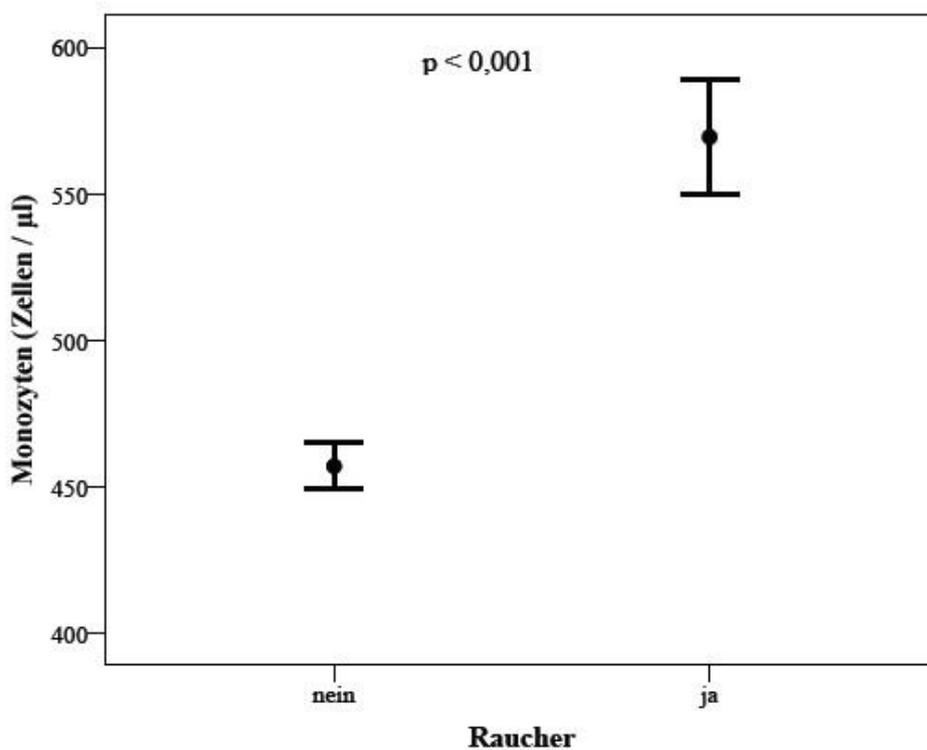


Abbildung 4 - Gesamtmonozytenzahl bei Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

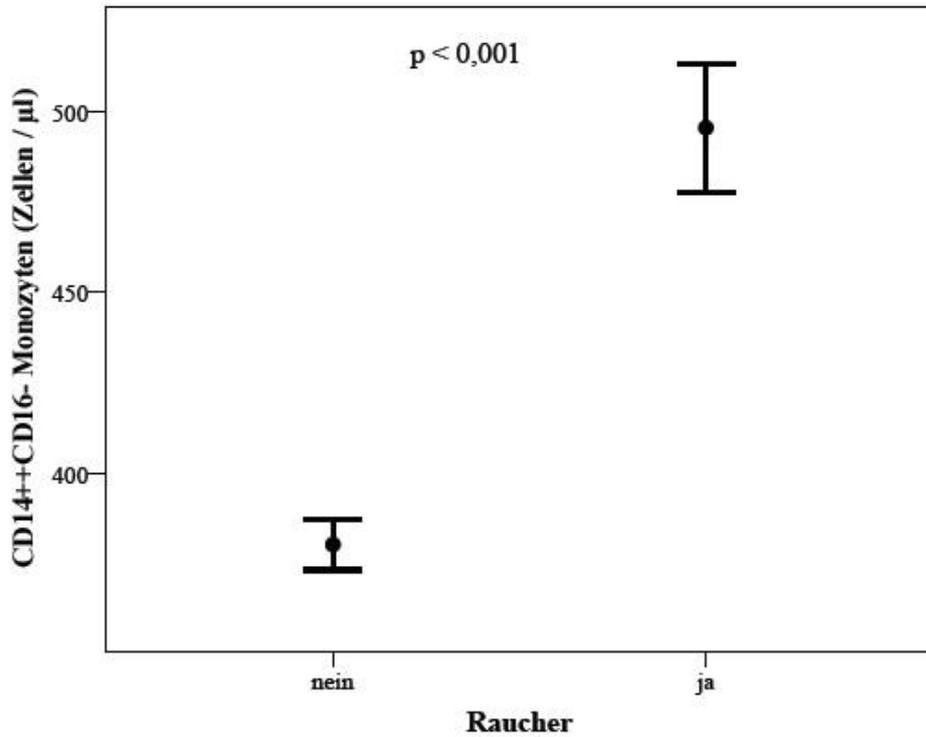


Abbildung 5 - Anzahl der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> - Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

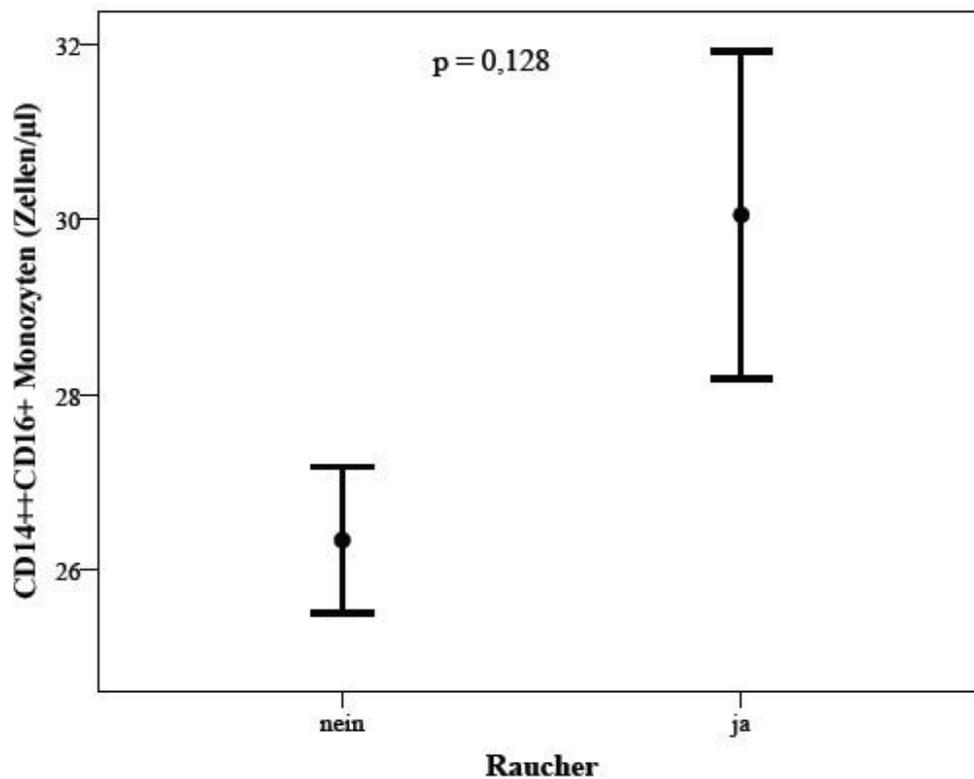


Abbildung 6 - Anzahl der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

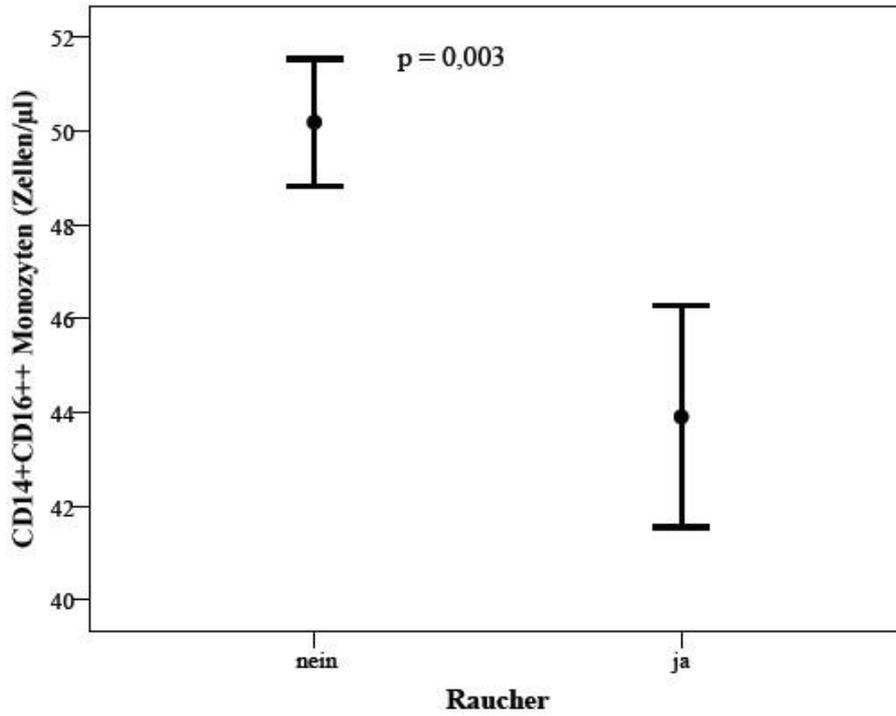


Abbildung 7 - Anzahl der CD14+CD16++ Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

## 4.4. Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die Monozytendifferenzierung

### 4.4.1 Differenzierung der Monozyten *in vitro* unter Einfluss von Benzo(a)pyren und $\alpha$ -Naphthoflavon

Während der dreizehntägigen Vermehrung von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen konnte keine Hochregulation der Oberflächenexpression von CD14 und CD16 festgestellt werden. Nach dieser Vermehrungsperiode wurden CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten für 18 Tage in Stammzell-Differenzierungsmedium kultiviert. Die Monozyten differenzierten sich zunächst nach zwei bis drei Tagen in CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten mit maximaler Zellzahl zwischen dem siebten und neunten Tag; später konnte man dann auch CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten beobachten. Eine weitere Differenzierung in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten wurde nicht festgestellt. Schlussendlich wurde mikroskopisch eine Entwicklung dendritischer Zellen beobachtet.

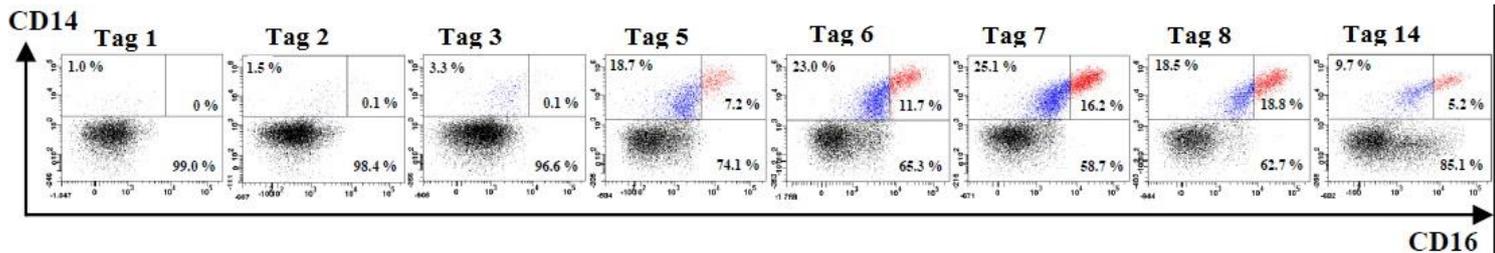


Abbildung 8 – Differenzierung von Monozytensubpopulationen aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen *in vitro*

### 4.4.2 Einfluss der Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors auf die *in vitro* Differenzierung der Monozytensubpopulationen

Da die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors einen Einfluss auf die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen hat (van Grevenynghe, Bernard et al. 2005), wurde in unserem Experiment ein Einfluss des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors auf die Differenzierung der einzelnen Monozytensubpopulationen untersucht.

Während acht Tagen wurde die Differenzierung der Monozyten mit und ohne Hinzugabe von Benzo(a)pyren beobachtet. Hier hat sich gezeigt, dass unter Einfluss von Benzo(a)pyren von allen Zellen vor allem die CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten dezimiert

wurden (Kontrolle  $12.8 \pm 1.9 \%$  und  $4.4 \pm 2.7 \%$  Benzo(a)pyren). Dieser Effekt wurde teils durch den Einfluss von  $\alpha$ -Naphthoflavin antagonisiert ( $5.8 \pm 3.1 \%$ ).

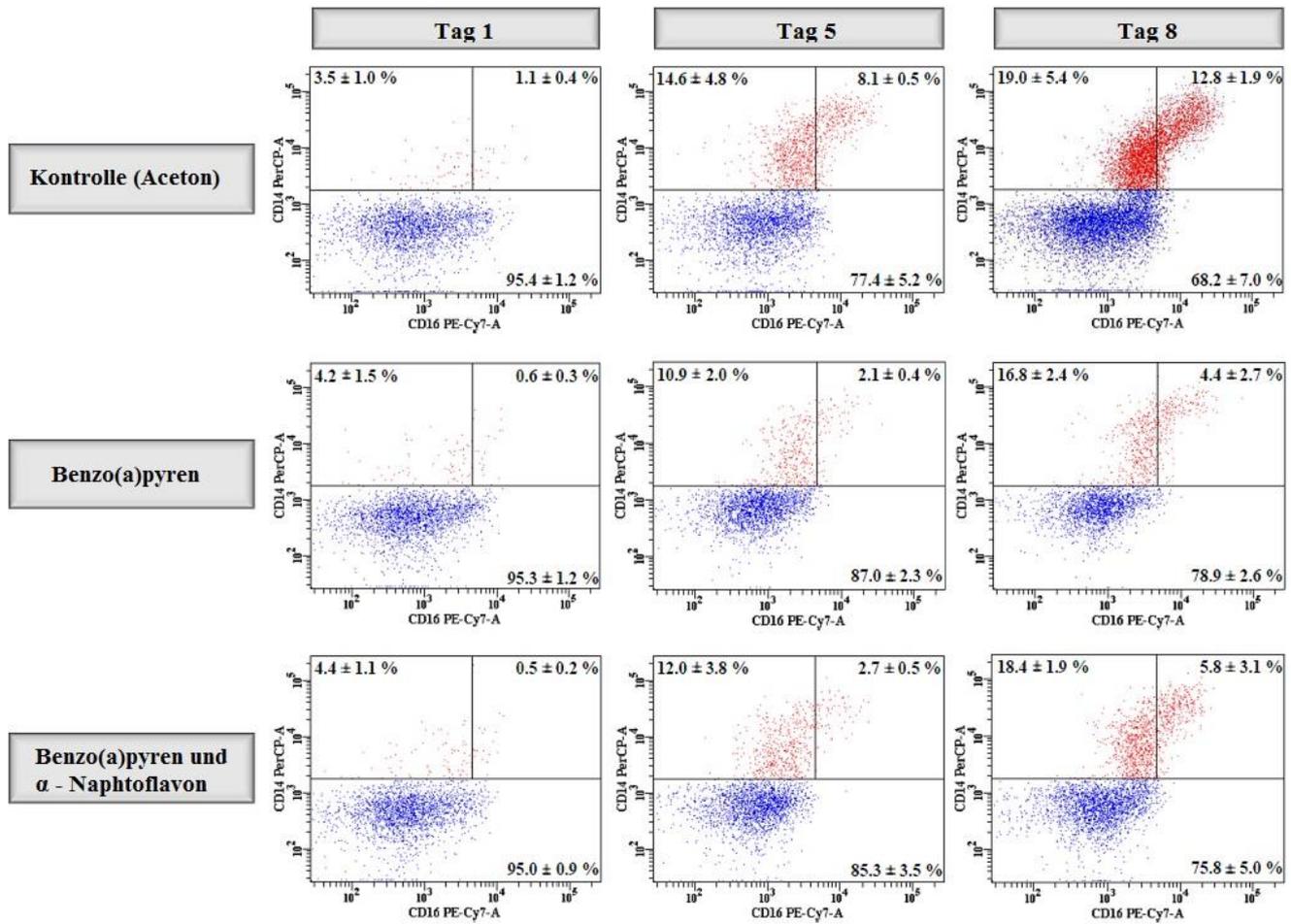


Abbildung 9 – Differenzierung der Monozyten unter Einfluss der AHR-Aktivatoren Benzo(a)pyren und  $\alpha$ -Naphthoflavin. Durchschnittswerte und Standardabweichung von unabhängigen Experimenten an Tag 1, 5 und 8.

## **5. DISKUSSION**

### **5.1 Monozytensubpopulationen als Entzündungsmarker**

Die CD16-positiven Monozyten wurden mit Entzündungsgeschehen unterschiedlicher Genese in Verbindung gebracht. Diverse Untersuchungen haben ergeben, dass die Anzahl an CD16-positiven Monozyten im Blut generell bei entzündlichen Erkrankungen und unabhängig von deren Ätiologie signifikant erhöht ist (Merino, Buendia et al. 2011). Wesentlicher Aspekt, welcher dieses Erkenntnis unterstützt, ist die Produktion von Zytokinen: Die Sekretion von proinflammatorischen Interleukinen IL-1 und IL-6 wird vermehrt bei CD16-positiven Monozyten beobachtet (Ancuta, Wang et al. 2006; Cros, Cagnard et al. 2010). Hingegen wird das anti-inflammatorische IL-10 von CD16-Monozyten gebildet. Der Zusammenhang zwischen Entzündungsgeschehen und Vorhandensein der CD16-positiven Monozytensubpopulation wird auch in unserer Studie beobachtet, da der Entzündungsmarker C-reaktives Protein und die Zellzahlen der CD16-positiven Monozyten eine positive Korrelation zeigen.

### **5.2 Monozytensubpopulationen und Atherosklerose**

Diverse Studien haben sich mit der Untersuchung der Monozytensubpopulationen bei Patientengruppen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil und mit manifesten kardiovaskulären Erkrankungen beschäftigt.

#### ***5.2.1 Monozytensubpopulationen bei chronischen Nierenerkrankungen***

Eine Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion ist ein nicht-traditioneller kardiovaskulärer Risikofaktor und Patienten mit chronischer Nierenerkrankung gelten neben Diabetikern als höchste Risikogruppe für die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen. Sowohl in Querschnittsanalysen, welche etwa bei nierentransplantierten Patienten eine positive Korrelation zwischen CD16-positiven Monozyten und subklinischer Atherosklerose zeigt (Ulrich, Heine et al. 2008), als auch in prospektiven Studien wurde eine Rolle dieser Monozytensubpopulation in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen postuliert. So konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, sowohl bei Dialysepatienten (Heine, Ulrich et al. 2008); (Rogacev, Ziegelin et al. 2009; Ulrich, Heine et al. 2010) als auch bei chronisch nierenkranken Menschen vor Eintritt der Dialysepflichtigkeit erkannt werden, dass eine erhöhte Anzahl

an intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten bei chronischen Nierenerkrankungen eine prädiktive Rolle bezüglich kardiovaskulärem Outcome spielt (Rogacev, Seiler et al. 2011).

### **5.2.2 Monozytensubpopulationen bei Schlaganfall und Koronarer Herzerkrankung**

Die intermediäre Monozytensubpopulation ist auch bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu den anderen beiden Subpopulationen erhöht. Interessanterweise, zeigt die Erhöhung der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten bei akutem Schlaganfall jedoch im Gegensatz zu der ungünstigen Prognose bei Niereninsuffizienz einen eher günstigen Verlauf: In diesem Falle wurden die erhöhten CD16-positiven Monozyten sogar als vorteilhaft für Schlaganfallpatienten gewertet (Urrea, Villamor et al. 2009). Die Erklärung hierfür lieferte die Hypothese, dass die intermediären Monozyten in die infarzierte Hirnregion einwandern und dort die Reparatur des Gewebes anregen. Es wird postuliert, dass die intermediären Monozyten nach Migration einen weniger inflammatorischen Phänotyp entwickeln und somit eher förderlich für die Heilung des Gewebes seien. Dieses Modell beruht jedoch bis dato nur auf einer Studie an Ly6C<sup>low</sup> Mausmonozyten, welche eher mit den menschlichen nicht-klassischen Monozyten als mit den intermediären Monozyten vergleichbar sind (Auffray, Fogg et al. 2007; Nahrendorf, Swirski et al. 2007).

Eine drei Jahre später veröffentlichte klinische Beobachtungsstudie brachte hingegen eine erhöhte Anzahl von intermediären Monozyten in Verbindung mit nachgewiesenem schwerwiegendem ischämischem Insult (Kaito, Araya et al. 2013). Hier wird das Ergebnis wiederum mit der proinflammatorischen Eigenschaft dieser Zellpopulation erläutert.

Diese kontradiktorischen Ergebnisse verlangen weitere ausführliche prospektive Studien.

Im Falle von koronarer Herzerkrankung zeigen die Studien ebenfalls überraschende Ergebnisse: So zeigte sich, dass die CD16-positiven Monozyten bei stabiler Angina pectoris mit einer oder mehreren vulnerablen Plaques, bei instabiler Angina pectoris mit der Dicke der atheromatösen Plaque in Zusammenhang stehen (Imanishi, Ikejima et al. 2010; Kashiwagi, Imanishi et al. 2010). Bei näherer Betrachtung der CD16-positiven Monozyten sind jedoch nicht wie vielleicht erwartet die intermediären, sondern die nicht klassischen Monozyten erhöht (Tallone, Turconi et al. 2011).

Als erste prospektive Longitudinalstudie verdeutlichte die HOM SWEET HOME Studie die prädiktive Rolle der intermediären Monozyten für kardiovaskuläres Outcome: Diese Studie rekrutierte 951 Probanden mit kardiovaskulärem Risikoprofil, welche während durchschnittlich zweieinhalb Jahren jährlich nachverfolgt wurden. So wie in unseren Ergebnissen auch nachgewiesen, korrelierten zunächst alle drei Monozytensubpopulationen mit dem Entzündungsmarker CRP und Leukozytengesamtzahl. Die Subpopulationen im Einzelnen betrachtet zeigten zum einen eine positive Korrelation zwischen intermediären und nicht klassischen Monozyten und kardiovaskulären Risikofaktoren (BMI, Niereninsuffizienz, Alter, Triglyceride); dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls in einer vorangegangenen Studie (Hristov, Leyendecker et al. 2010).

Als zentrales Studienergebnis erkennt die HOM SWEET HOME Studie, dass eine erhöhte Anzahl an intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse ist. Dieses Ergebnis blieb nach Adjustierung für klassische kardiovaskuläre und nephrologische Risikofaktoren statistisch signifikant (Rogacev, Cremers et al. 2012).

Aufgrund der bis dato veröffentlichten Ergebnisse über die Relation zwischen Monozytensubpopulationen und kardiovaskulären Erkrankungen könnte man darauf zurückschließen, dass vor allem die intermediären Monozyten mit klassischen Risikofaktoren positiv korrelieren. Die Ergebnisse unserer Studie haben jedoch gezeigt, dass von den drei Monozytensubpopulationen am ehesten die nicht klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten mit kardiovaskulären Risikofaktoren korrelieren. Dies trifft auf Gewicht, BMI, systolischen und diastolischen Blutdruck, interessanterweise aber nicht auf LDL-Cholesterin zu. Bei den beiden anderen Monozytensubpopulationen konnte man keine stärkere Korrelation mit den gemessenen Risikofaktoren feststellen. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis lässt sich allenfalls auf unsere Studienkohorte zurückführen, da es sich bei I LIKE HOME nicht um bereits kardiovaskulär erkrankte, sondern um gesunde Probanden handelt.

### 5.3 Nikotinkonsum und Monozytensubpopulationen

Es existieren zahlreiche Studien, welche den Zusammenhang von Leukozyten und Zigarettenkonsum untersucht haben. In allen Studien wird das Rauchen von Zigaretten als wichtiger Einflussfaktor für die periphere Leukozytenzahl im Blut erkannt, wobei Raucher im Gegensatz zu Nichtrauchern erhöhte Leukozytenwerte haben (Corre, Lellouch et al. 1971; Friedman, Siegelau et al. 1973; Schwartz and Weiss 1994; Parry, Cohen et al. 1997; Rudolph, Rudolph et al. 2008). Die Ergebnisse unserer Studie zeigen ebenfalls eine signifikant höhere Leukozytenzahl bei Rauchern verglichen mit Nichtrauchern. Wie bereits 1996 in der Studie von Freedman veröffentlicht, ist die Differenz vor allem bei den neutrophilen Granulozyten und den Lymphozyten zu sehen (Freedman, Flanders et al. 1996).

Betrachtet man nun spezifisch die Monozyten, so zeigen unsere Ergebnisse eine erhöhte Anzahl der Gesamtmonozyten unter den Rauchern. Dieses Ergebnis wird durch eine Vielzahl vorangegangener Studien bestätigt (Nielsen 1985; Schwartz and Weiss 1994; Freedman, Flanders et al. 1996).

Unsere Studie interessierte sich besonders für die Relation zwischen Nikotinkonsum und den einzelnen Monozytensubpopulationen. Da die CD16-positiven Monozyten eine positive Korrelation mit Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen zeigen und zudem Zigarettenkonsum als hoher Risikofaktor für Entstehung von Atherosklerose und Folgeerkrankungen gilt postulierten wir, dass Raucher erhöhte Zellzahlen der CD16-positiven Monozyten aufzeigen.

Entgegen dieser Hypothese zeigten Raucher jedoch im Vergleich zu Nichtrauchern erhöhte Zellzahlen der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, während die Zellzahlen der CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten nur tendenziell erhöht waren. Nichtraucher im Gegensatz hatten gegenüber Rauchern höhere Zellzahlen der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten. Ein Anhaltspunkt, welcher diesen Sachverhalt begründen könnte, lässt sich möglicherweise in der Biologie der Myelopoese finden.

Man nimmt an, dass die drei Monozytensubpopulationen unterschiedliche Reifungsstadien der myeloischen Zellreihe darstellen. So hat man zunächst herausgefunden, dass die CD16-positiven Monozyten eine höhere Differenzierung als die CD16<sup>-</sup> Monozyten aufzeigen (Ancuta, Liu et al. 2009). Mittlerweile geht man davon aus, dass die Monozyten das Knochenmark als klassische CD16<sup>-</sup> Monozyten verlassen,

welche sich dann innerhalb von ein paar Tagen im peripheren Blut zunächst zu CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und schlussendlich zu CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten differenzieren (Zawada, Rogacev et al. 2011).

Eine mögliche Begründung für die Verschiebung der Monozytensubpopulationsverteilung bei Rauchern sind die unterschiedlichen Effekte einzelner im Tabakrauch enthaltener Stoffe. Es ist schon seit längerem bekannt, dass das Rauchen von Zigaretten das Knochenmark und die Reifung der Zellen im Knochenmark beeinflusst: Eine Studie von 1997 hat im Tierversuch gezeigt, dass unter Exposition von Zigarettenrauch das Knochenmark stimuliert und somit ein schnellerer Übergang von sowohl reifen als auch unreifen Zellen in den Kreislauf veranlasst wird (Terashima, Wiggs et al. 1997).

Im Zigarettenrauch enthaltene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, welche bei der inkompletten Verbrennung von organischem Material entstehen, gelten als potente immunsuppressive Moleküle und wirken nachweislich auf die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen im Knochenmark ein.

Unter Einfluss polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe ist die Funktionalität der Makrophagen gehemmt, was sich in verminderter Phagozytose, verminderter HLAII-Rezeptorexpression und verminderter Produktion von NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reflektiert.

Hämatopoetische CD34<sup>+</sup> Stammzellen sind unter Einwirkung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in ihrem Wachstum gehemmt – unabhängig von der Dauer der Stimulation mit den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen.

Demgemäß wird durch diese Wachstumshemmung auch die Differenzierung der Stammzellen zur Makrophagenzelllinie beeinträchtigt (Ogawa 1993; van Grevenynghe, Sparfel et al. 2004; van Grevenynghe, Bernard et al. 2005).

Benzo(a)pyren (BP) und 7,12-dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) gehören zu den karzinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, welche mitunter am häufigsten im Zigarettenrauch enthalten sind (Ding, Ashley et al. 2007). Diverse Studien haben die Wirkung von diesen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf Monozyten und Makrophagen in vivo und in vitro untersucht. Im Allgemeinen wird ihre Wirkung über die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors vermittelt. In einer in vivo Studie mit Mäusen, denen intraperitoneal BP und DMBA injiziert wurde, stellte sich heraus, dass DMBA eine Supprimierung der Reifung von Monozytenvorläuferzellen

bewirkt. Auf der anderen Seite erhöhte sich die Zellzahl der Monozyten unter Einfluss von BP (Galvan, Page et al. 2006). Eine ältere in vitro Studie über die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen belegte eindeutig, dass die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in einer Dosis, wie sie im Zigarettenrauch zu finden ist, die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unterdrückten (van Grevenynghe, Rion et al. 2003). Dies bestätigt auch unsere Ergebnisse über eine erhöhte Monozytenanzahl bei zugleich geringerer Differenzierung der Monozyten im peripheren Blut von Rauchern.

Die experimentellen Resultate unserer Studie unterstützen die Hypothese eines immunmodulierenden Einflusses von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen: man konnte eine Differenzierung der Monozyten bis zu den intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten, jedoch nicht weiter zu den höher differenzierten nicht klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten beobachten. Es gibt viele verschiedene Arylhydrocarbonrezeptoren, welche durch intrazelluläre Kaskaden die Stammzellteilung und – differenzierung regulieren. Die genauen Mechanismen, welche dem Einfluss auf die Stammzellen unterliegen sind bis dato unbekannt (Gasiewicz, Singh et al. 2010; Lindsey and Papoutsakis 2012). Ein weiterer Einflussfaktor der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe ist die Rezeptorexpression der Monozyten. In der gleichen Studie von van Grevenynghe hat man herausgefunden, dass die Monozyten unter Exposition von BP die Expression ihrer Oberflächenrezeptoren signifikant reduziert haben. Hiervon betroffen war unter anderem der von uns ebenfalls untersuchte CD16-Rezeptor, wohingegen die Expression von CD14 und des Scavenger Rezeptors CD36 unverändert blieb (van Grevenynghe, Rion et al. 2003). Da letztere eine große Rolle bei der Initiierung atherosklerotischer Läsionen spielen, unterstützt die unveränderte Expression von CD36 das stärkere Vorkommen von Atherosklerose bei Rauchern - trotz verminderter Anzahl an proinflammatorischen intermediären Monozyten. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch die Resultate weiterer Studien, welche dem Scavenger Rezeptor CD36 proatherogenes Potential zuschreiben (Febbraio, Podrez et al. 2000; Febbraio, Guy et al. 2004; Guy, Kuchibhotla et al. 2007). Eine Studie über die Depletion des Scavenger Rezeptors CD36 an den Monozyten von Mäusen hat zudem zu einer verminderten Anzahl atherosklerotischer Plaques geführt und zu der Schlussfolgerung geleitet, dass das Fehlen von CD36 einen protektiven Faktor für Atherogenese darstellt. (Kuchibhotla, Vanegas et al. 2008).

Anhand dieser Studienergebnisse lassen sich zum einen unsere Ergebnisse über eine erhöhte Anzahl der Gesamtmonozyten bei Rauchern und die unterschiedliche Verteilung der drei Monozytensubpopulationen im Blut von Rauchern und Nichtrauchern erklären. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit denen der bisherigen Studien, stellt man fest, dass der Nikotinkonsum einen unbedingten Einfluss auf die Myelopoese hat. Dieser Effekt ist vermutlich auf die im Zigarettenrauch enthaltenen immunsupprimierenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zurückzuführen, wessen differenzierungshemmende Potenz sich zum einen auf die myeloischen Stammzellen und zum anderen auf die Monozyten selbst auswirkt. In diesem Zusammenhang lässt sich verstehen, weshalb bei Rauchern nicht wie erwartet die intermediären – also höher differenzierten – Monozyten, sondern die CD16<sup>-</sup> Monozyten vorrangig im Blut nachzuweisen waren.

#### **5.4 Fazit und Ausblick**

Unsere zu Beginn der Studie aufgestellte Hypothese, dass bei Rauchern im peripheren Blut erhöhte Zellzahlen der proinflammatorischen intermediären CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> Monozyten vorhanden sind, wurde durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt. Eine mögliche Erklärung liefern Studien, die aufzeigen, dass im Zigarettenrauch freigesetzte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe durch ihr immunmodulierendes Potenzial eine verminderte Differenzierung von unreifen Monozyten bewirken. Des Weiteren provozieren diese im Zigarettenrauch freigesetzten Stoffe ebenfalls einen verfrühten Übergang noch nicht komplett ausgereifter Monozyten aus dem Knochenmark ins Blut.

Die Korrelation der Subpopulationen mit kardiovaskulären Risikofaktoren hat sich auch in unserer Studie herauskristallisiert – mit dem Unterschied, dass vor allem die nicht klassischen CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten eine positive Korrelation aufgezeigt haben. Dieses Resultat lässt sich am ehesten mit dem Kollektiv unserer Probanden erklären, da es sich bei I LIKE HOME II im Gegensatz zu vorherigen Studien um gesunde Probanden handelte.

Da sich auch in unseren Ergebnissen die Korrelation der intermediären Monozytensubpopulation mit dem Entzündungsmarker CRP bestätigt und diese

Zellpopulation in enger Relation zur Atherogenese gesehen wird, könnte in näherer Zukunft in weiteren klinischen Studien eine mögliche kausale Bedeutung dieser Monozytensubpopulation näher erforscht werden und gegebenenfalls therapeutische Möglichkeiten zur Modulation dieser Zellen charakterisiert werden.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Ancuta, P., K. Y. Liu, et al. (2009). "Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets." BMC Genomics **10**: 403.
- Ancuta, P., A. Moses, et al. (2004). "Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions." Immunobiology **209**(1-2): 11-20.
- Ancuta, P., R. Rao, et al. (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." J Exp Med **197**(12): 1701-1707.
- Ancuta, P., J. Wang, et al. (2006). "CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells." J Leukoc Biol **80**(5): 1156-1164.
- Auffray, C., D. Fogg, et al. (2007). "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." Science **317**(5838): 666-670.
- Auffray, C., M. H. Sieweke, et al. (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." Annu Rev Immunol **27**: 669-692.
- Belge, K. U., F. Dayyani, et al. (2002). "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." J Immunol **168**(7): 3536-3542.
- Blann, A. D., C. Steele, et al. (1997). "The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers." Thromb Res **85**(5): 433-438.
- Braunersreuther, V., A. Zernecke, et al. (2007). "Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(2): 373-379.
- Chapman, C. M., J. P. Beilby, et al. (2004). "Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis." Stroke **35**(7): 1619-1624.
- Corre, F., J. Lellouch, et al. (1971). "Smoking and leucocyte-counts. Results of an epidemiological survey." Lancet **2**(7725): 632-634.
- Cottam, D. R., P. A. Schaefer, et al. (2002). "Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity." Obes Surg **12**(3): 335-342.
- Craig, W. Y., G. E. Palomaki, et al. (1989). "Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data." BMJ **298**(6676): 784-788.
- Cros, J., N. Cagnard, et al. (2010). "Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors." Immunity **33**(3): 375-386.
- Crowe, S. M., C. L. Westhorpe, et al. (2010). "The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis." J Leukoc Biol **87**(4): 589-598.
- Csiszar, A., A. Podlutzky, et al. (2009). "Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 3128-3144.
- Cybulsky, M. I., A. H. Lichtman, et al. (1999). "Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis." Clin Chim Acta **286**(1-2): 207-218.
- Dayyani, F., K. U. Belge, et al. (2003). "Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes." J Leukoc Biol **74**(1): 33-39.
- Ding, Y. S., D. L. Ashley, et al. (2007). "Determination of 10 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke." J Agric Food Chem **55**(15): 5966-5973.
- Febbraio, M., E. Guy, et al. (2004). "Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2333-2338.
- Febbraio, M., E. A. Podrez, et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." J Clin Invest **105**(8): 1049-1056.
- Fingerle-Rowson, G., M. Angstwurm, et al. (1998). "Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy." Clin Exp Immunol **112**(3): 501-506.
- Fingerle, G., A. Pforte, et al. (1993). "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is

- expanded in sepsis patients." *Blood* **82**(10): 3170-3176.
- Freedman, D. S., W. D. Flanders, et al. (1996). "Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men." *Ann Epidemiol* **6**(4): 299-306.
- Friedman, G. D., A. B. Siegel, et al. (1973). "Smoking habits and the leukocyte count." *Arch Environ Health* **26**(3): 137-143.
- Galvan, N., T. J. Page, et al. (2006). "Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages." *Toxicol Appl Pharmacol* **213**(2): 105-116.
- Gasiewicz, T. A., K. P. Singh, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene-induced hematopoietic toxicity." *Chem Biol Interact* **184**(1-2): 246-251.
- Guy, E., S. Kuchibhotla, et al. (2007). "Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed CD36<sup>0</sup>/apoE<sup>0</sup> mice." *Atherosclerosis* **192**(1): 123-130.
- Hansson, G. K. and A. Hermansson (2011). "The immune system in atherosclerosis." *Nat Immunol* **12**(3): 204-212.
- Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." *Nat Rev Immunol* **6**(7): 508-519.
- Hansson, G. K., A. K. Robertson, et al. (2006). "Inflammation and atherosclerosis." *Annu Rev Pathol* **1**: 297-329.
- Harats, D., M. Ben-Naim, et al. (1989). "Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages." *Atherosclerosis* **79**(2-3): 245-252.
- Heine, G. H., A. Ortiz, et al. (2012). "Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease." *Nat Rev Nephrol*.
- Heine, G. H., C. Ulrich, et al. (2008). "CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients." *Kidney Int* **73**(5): 622-629.
- Hepburn, A. L., J. C. Mason, et al. (2004). "Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **43**(5): 547-554.
- Horelt, A., K. U. Belge, et al. (2002). "The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production." *Eur J Immunol* **32**(5): 1319-1327.
- Hristov, M., T. Leyendecker, et al. (2010). "Circulating monocyte subsets and cardiovascular risk factors in coronary artery disease." *Thromb Haemost* **104**(2): 412-414.
- Imanishi, T., H. Ikejima, et al. (2010). "Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris." *Atherosclerosis* **212**(2): 628-635.
- Jonasson, L., J. Holm, et al. (1986). "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." *Arteriosclerosis* **6**(2): 131-138.
- Kaito, M., S. Araya, et al. (2013). "Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients." *PLoS One* **8**(8): e69409.
- Kalra, V. K., Y. Ying, et al. (1994). "Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells." *J Cell Physiol* **160**(1): 154-162.
- Kashiwagi, M., T. Imanishi, et al. (2010). "Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris." *Atherosclerosis* **212**(1): 171-176.
- Kawanaka, N., M. Yamamura, et al. (2002). "CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **46**(10): 2578-2586.
- Kocaman, S. A., A. Sahinarslan, et al. (2011). "The particular interactions of the traditional cardiovascular risk factors with different circulating specific leukocyte subtype counts in blood: an observational study." *Anadolu Kardiyol Derg* **11**(7): 573-581.
- Kuchibhotla, S., D. Vanegas, et al. (2008). "Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II." *Cardiovasc Res* **78**(1): 185-196.
- Lau, P. P., L. Li, et al. (2006). "Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and

- the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor(-/-) mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(1): 143-149.
- Lindsey, S. and E. T. Papoutsakis (2012). "The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis." *Stem Cell Rev* **8**(4): 1223-1235.
- Merino, A., P. Buendia, et al. (2011). "Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity." *J Immunol* **186**(3): 1809-1815.
- Nahrendorf, M., F. K. Swirski, et al. (2007). "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." *J Exp Med* **204**(12): 3037-3047.
- Nasir, K., E. Guallar, et al. (2005). "Relationship of monocyte count and peripheral arterial disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(9): 1966-1971.
- Nielsen, H. (1985). "A quantitative and qualitative study of blood monocytes in smokers." *Eur J Respir Dis* **66**(5): 327-332.
- Norris, D. A., R. M. Morris, et al. (1979). "Isolation of functional subsets of human peripheral blood monocytes." *J Immunol* **123**(1): 166-172.
- Ogawa, M. (1993). "Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells." *Blood* **81**(11): 2844-2853.
- Parry, H., S. Cohen, et al. (1997). "Smoking, alcohol consumption, and leukocyte counts." *Am J Clin Pathol* **107**(1): 64-67.
- Passlick, B., D. Flieger, et al. (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." *Blood* **74**(7): 2527-2534.
- Poitou, C., E. Dalmas, et al. (2011). "CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(10): 2322-2330.
- Rajavashisth, T. B., A. Andalibi, et al. (1990). "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins." *Nature* **344**(6263): 254-257.
- Rogacev, K. S., B. Cremers, et al. (2012). "CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography." *J Am Coll Cardiol* **60**(16): 1512-1520.
- Rogacev, K. S. and G. H. Heine (2010). "Human monocyte heterogeneity--a nephrological perspective." *Nephrol Ther* **6**(4): 219-225.
- Rogacev, K. S., S. Seiler, et al. (2011). "CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease." *Eur Heart J* **32**(1): 84-92.
- Rogacev, K. S., C. Ulrich, et al. (2010). "Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis." *Eur Heart J* **31**(3): 369-376.
- Rogacev, K. S., M. Ziegelin, et al. (2009). "Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome." *Nephrol Dial Transplant* **24**(11): 3480-3486.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-126.
- Rudolph, T. K., V. Rudolph, et al. (2008). "Contribution of myeloperoxidase to smoking-dependent vascular inflammation." *Proc Am Thorac Soc* **5**(8): 820-823.
- Saha, P. and F. Geissmann (2011). "Toward a functional characterization of blood monocytes." *Immunol Cell Biol* **89**(1): 2-4.
- Scheffler, E., E. Wiest, et al. (1992). "Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein." *Clin Invest* **70**(3-4): 263-268.
- Schlitt, A., G. H. Heine, et al. (2004). "CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels." *Thromb Haemost* **92**(2): 419-424.
- Schwartz, J. and S. T. Weiss (1994). "Cigarette smoking and peripheral blood leukocyte differentials." *Ann Epidemiol* **4**(3): 236-242.
- Shen, Y., V. Rattan, et al. (1996). "Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes." *Am J Physiol* **270**(5 Pt 2): H1624-1633.

- Skalen, K., M. Gustafsson, et al. (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.
- Smith, J. D., E. Trogan, et al. (1995). "Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8264-8268.
- Soares, G., A. Barral, et al. (2006). "CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data." J Leukoc Biol **79**(1): 36-39.
- Steinberg, D. (2002). "Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime." Nat Med **8**(11): 1211-1217.
- Tabas, I., K. J. Williams, et al. (2007). "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications." Circulation **116**(16): 1832-1844.
- Tachmes, L., R. J. Fernandez, et al. (1978). "Hemodynamic effects of smoking cigarettes of high and low nicotine content." Chest **74**(3): 243-246.
- Tallone, T., G. Turconi, et al. (2011). "Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets." J Cardiovasc Transl Res **4**(2): 211-219.
- Terashima, T., B. Wiggs, et al. (1997). "The effect of cigarette smoking on the bone marrow." Am J Respir Crit Care Med **155**(3): 1021-1026.
- Thieblemont, N., L. Weiss, et al. (1995). "CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection." Eur J Immunol **25**(12): 3418-3424.
- Ulrich, C., G. H. Heine, et al. (2006). "Increased expression of monocyte angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease." Nephrol Dial Transplant **21**(6): 1596-1602.
- Ulrich, C., G. H. Heine, et al. (2008). "Proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients." Am J Transplant **8**(1): 103-110.
- Ulrich, C., G. H. Heine, et al. (2010). "Circulating monocyte subpopulations with high expression of angiotensin-converting enzyme predict mortality in patients with end-stage renal disease." Nephrol Dial Transplant **25**(7): 2265-2272.
- Urrea, X., N. Villamor, et al. (2009). "Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke." J Cereb Blood Flow Metab **29**(5): 994-1002.
- van Grevenynghe, J., M. Bernard, et al. (2005). "Human CD34-positive hematopoietic stem cells constitute targets for carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons." J Pharmacol Exp Ther **314**(2): 693-702.
- van Grevenynghe, J., S. Rion, et al. (2003). "Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages." J Immunol **170**(5): 2374-2381.
- van Grevenynghe, J., L. Sparfel, et al. (2004). "Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages." Biochem Biophys Res Commun **317**(3): 708-716.
- Vanham, G., K. Edmonds, et al. (1996). "Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection." Clin Exp Immunol **103**(1): 30-34.
- Waterhouse, D. F., R. A. Cahill, et al. (2008). "Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population." Vasc Health Risk Manag **4**(1): 177-187.
- Yasaka, T., N. M. Mantich, et al. (1981). "Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets." J Immunol **127**(4): 1515-1518.
- Zawada, A. M., K. S. Rogacev, et al. (2011). "SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset." Blood **118**(12): e50-61.
- Zernecke, A., E. A. Liehn, et al. (2006). "Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10." Blood **107**(11): 4240-4243.

Zernecke, A., E. Shagdarsuren, et al. (2008). "Chemokines in atherosclerosis: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1897-1908.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation." J Leukoc Biol **81**(3): 584-592.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, et al. (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." Blood **116**(16): e74-80.

## **7. Danksagung**

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Gunnar Heine. Er stellte mir das Thema zur Verfügung und war eine unverzichtbare Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat Adam Zawada sowie Frau Martina Wagner danke ich, für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor und das Erlernen der Methoden. Sie standen mir bei Fragen stets zur Seite und waren eine geduldige Hilfe beim Auftauchen unvorhergesehener Probleme bei den Versuchen.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Herrn Dr. med. Kyrill Rogačev, welcher jederzeit für auftretende Probleme ansprechbar war und mir bei Auswertung und Diskussion der Arbeit immer mit seiner Erfahrung zur Seite stand.

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

Mein letzter Dank gilt meinen verstorbenen Großeltern Eugène Kintziger und Joséphine Kintziger-Tangeten, sowie meiner verstorbenen Tante Henriette Kintziger, welche mich zu Lebzeiten ebenfalls immer unterstützt haben und mir eine große Motivation für das Medizinstudium waren.

## **8. Anhang**

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 – Zelluläre Zusammensetzung einer atherosklerotischen Plaque (Quelle: Hansson et al. 2006).....	11
Abbildung 2 – Durchflusszytometrische Untersuchung von Monozytensubpopulationen (Quelle: Rogacev et al. 2012) .....	13
Abbildung 3 - Leukozytenzahl bei Rauchern und Nichtrauchern. ....	33
Abbildung 4 - Gesamtmonozytenzahl bei Rauchern und Nichtrauchern. ....	33
Abbildung 5 - Anzahl der CD16-negativen Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern .....	34
Abbildung 6 - Anzahl der CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern ...	34
Abbildung 7 - Anzahl der CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> Monozyten bei Rauchern und Nichtrauchern. ..	35
Abbildung 8 – Differenzierung von Monozytensubpopulationen aus CD34 <sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen in vitro .....	36
Abbildung 9 – Differenzierung der Monozyten unter Einfluss der AHR-Aktivatoren Benzo(a)pyren und $\alpha$ -Naphthoflavon. ....	37

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 - Substanzen und Medien.....	22
Tabelle 2 - Chemikalien.....	23
Tabelle 3 - Lösungen und Puffer.....	23
Tabelle 4 - Antikörper.....	24
Tabelle 5 - Kits .....	25
Tabelle 6 - Geräte.....	25
Tabelle 7 - Verbrauchsmaterial .....	26
Tabelle 8 - Charakteristika der I LIKE HOME II Studienkohorte.....	27
Tabelle 9 - Anthropometrische Messparameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Rauchern und Nicht-Rauchern.....	28
Tabelle 10 - Zellzahlen der Leukozyten und Leukozytensubpopulationen bei den I LIKE HOME II Studienteilnehmern .....	29
Tabelle 11 - Korrelationen von Zellzahlen der Monozyten(subpopulationen) mit	

anthropometrischen Messvariablen und kardiovaskulären Risikofaktoren ..... 30  
Tabelle 12 - Zellzahlen der Leukozyten(subpopulationen) bei Rauchern und  
Nichtrauchern..... 32

## **Fragebogen**

### Bei Einschluss

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

Ja      Details \_\_\_\_\_

Nein

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

Ja    Details \_\_\_\_\_

Nein

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

Ja    Details \_\_\_\_\_

Nein

4. Sind Ihre Halsschlagadern operiert oder mittels Katheter aufgedehnt?

Ja    Details \_\_\_\_\_

Nein

5. Sind Ihre Becken- oder Beinschlagadern mittels Bypass operiert oder aufgedehnt (dies umfasst keine Krampfadern-OP)?

Ja    Details \_\_\_\_\_

Nein

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

Ja Details \_\_\_\_\_

Nein

7. Haben Sie jemals geraucht?

Ja

Nein (weiter mit Frage 12)

8. Rauchen Sie aktuell?

Ja

Nein

9. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

\_\_\_\_\_

10. Wie viele Jahre haben Sie insgesamt geraucht?

\_\_\_\_\_

11. Wie viele Päckchen haben Sie durchschnittlich am Tag über all diese Jahre geraucht?

\_\_\_\_\_

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

Ja

Nein

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

Ja

Nein

14. Ist bei Ihnen ein Diabetes mellitus bekannt?

Ja

Nein

15. Wie ist der Diabetes mellitus behandelt?

Insulin

blutzuckersenkende Tabletten

Diät

16. Wenn Sie das letzte Jahr betrachten, wieviele 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

Vor der Blutabnahme:

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

Ja, ohne Fieber >38,5°C Details \_\_\_\_\_

Ja, mit Fieber >38,5°C Details \_\_\_\_\_

Nein

2. Rauchen Sie aktuell?

Ja

Nein

3. Wann haben Sie die letzte Zigarette geraucht?

\_\_\_\_\_

4. An wie vielen Tagen der Woche betätigen Sie sich mind. 30 min sportlich in einem Ausmaß, daß Sie ins Schwitzen kommen? (falls „0“, weiter Frage 7)

\_\_\_\_\_

5. Welche Sportarten betreiben Sie hierbei mindestens einmal die Woche?

\_\_\_\_\_

6. Wann waren Sie zuletzt sportlich aktiv? Über wie viele Minuten?

\_\_\_\_\_

7a. Wie viele Stunden täglich schauen Sie unter der Woche (werktags, Mo-Fr) fern?

\_\_\_\_\_

7b. Wie viele Stunden täglich schauen Sie am Wochenende (Sa-So) fern?

\_\_\_\_\_

8. Waren Sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme über mindestens acht Stunden nüchtern (nüchtern schließt Nahrung und Kaffee aus)?

Ja

Nein

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

Ja

Nein

10. Wie heißen diese Medikamente oder Hormonpräparate?

---