Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Rottbauer)

Effekte moderaten Alkoholkonsums auf die Monozytenmigration bei gesunden Probanden

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Roza Blagieva
Sofia
2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Koenig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Kratzer

Tag der Promotion: 26. April 2013

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	
1	**Einleitung**	1
1.1	Atherosklerose	1
1.2	Der physiologische Gefäßwandaufbau	1
1.3	Monozyten und Makrophagen	2
1.4	Atherogenese	3
1.5	Alkohol	8
1.6	ICAM-1	12
1.7	E-Selektin	12
1.8	Fragestellung	13
2	**Material und Methode**	14
2.1	Überblick	14
2.1.1	Studienkollektiv	14
2.1.2	Studienablauf	15
2.1.3	Fragebogen	16
2.1.4	Blutabnahme	17
2.2	Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut	18
2.3	Migration der Monozyten	18
2.4	Verwendete Reagenzien	23
2.5	Geräte und Kits	24
2.6	Färbemethode	25
2.7	Auswertung	25
2.8	In vitro Stimulation von Monozyten mit Ethanol	25
2.9	Lösliches ICAM-1	26

2.10	Lösliches E-Selektin	26
2.11	Statistische Methoden	26
3	**Ergebnisse**	**27**
3.1	Ex Vivo Versuche	28
3.1.1	Zellstimulation mit MCP-1	28
3.1.2	Zellstimulation mit FMLP	30
3.2	In Vitro Versuche	32
3.3	Biomarker	33
3.3.1	E-Selektin	33
3.3.2	ICAM-1	34
4	**Diskussion**	**35**
5	**Zusammenfassung**	**39**
6	**Literaturverzeichnis**	**41**
	Danksagung	**46**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
BMI	Body Mass Index
C	Celsius
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
cl	Centiliter
CRP	C-reaktives Protein
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HDL	High-density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-1	Interleukin-1
Inc.	Incorporated
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density lipoprotein
l	Liter
µm	Mikrometer
MHC	Major histocompatibility complex
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MEOS	mikrosomale Ethanol oxidierende System
min	Minute
ml	Milliliter
MMPs	Matrix metalloproteinases
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
OxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein

pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumor necrosis factor α
TOAM	Tolerierbare obere Alkoholzufuhrmengen
U	Umdrehung
U/min	Umdrehung pro Minute
USA	United States of America
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgen wie z.B. die koronare Herzkrankheit (KHK) und zerebrovaskuläre Erkrankungen sind in Ländern mit hohem und mittlerem Einkommen die Haupttodesursache, wobei ihre Inzidenz weiterhin zunimmt (WHO, 2002). Die aktuellen Zahlen des statistischen Bundesamtes aus dem Jahre 2010 zeigen den hohen Stellenwert der Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Im Rahmen der Auswertung von Todesursachen können 41 Prozent der gesamten Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurückgeführt werden.

Die Atherosklerose ist ein chronischer, multifaktorieller Prozess. Obwohl die atherosklerotischen Veränderungen bereits im Kindesalter beginnen, zeigen sich klinische Manifestationen erst in der dritten bis vierten Lebensdekade. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren der Atherosklerose gehören das Alter, männliches Geschlecht sowie genetische Faktoren. Als beeinflussbare Riskofaktoren gelten arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas, Bewegungsmangel und Stress. Außerdem werden Hyperurikämie, Hypertriglyzeridämie, erhöhte Blutkonzentrationen von Lipoprotein (a), Homocystein und CRP (C-reaktives Protein) in ihrer Bedeutung als Riskofaktoren diskutiert [3], [4], [7], [29], [30], [31], [32], [37], [38], [29].
Die Atherosklerose ist eine Kombination von Veränderungen der Tunica intima arterieller Blutgefäße bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalzium („Kalkablagerungen“) verbunden mit Veränderungen der Tunica media der Arterien [34].

1.2 Der physiologische Gefäßwandaufbau

Grundsätzlich besteht die Arterienwand aus drei morphologisch unterschiedlichen Schichten:

- Tunica intima, kurz Intima
- Tunica media, kurz Media

- Tunica adventitia, kurz Adventitia

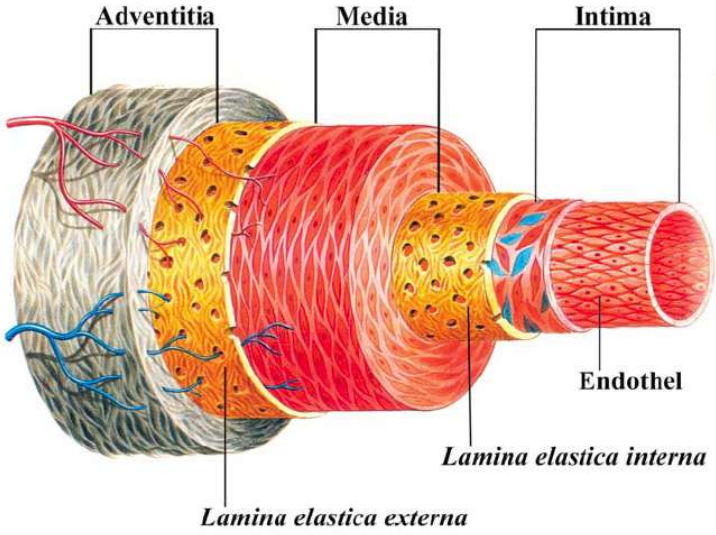


Abb. 1: Prinzipieller Aufbau der Gefäßwand, dargestellt am Beispiel einer Arterie vom elastischen Typ. Die Arterienwand besteht aus drei Schichten: Die Intima, bei der es sich um die innere Schicht handelt, die benachbarten Media und die sich außen befindliche Adventitia. Die Media wird durch die Lamina elastica interna von der Intima und durch die Lamina elastica externa von der Adventitia abgegrenzt. Modifiziert nach Akkermann et al. (1987)

Die Intima besteht aus einem einschichtigen Endothel, das die innere Oberfläche der Gefäße lückenlos auskleidet. Im Rahmen des Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausches agiert die Intima als Permeabilitätsbarriere, die den Substanzaustausch an der Arterienwand steuert.

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, zwischen denen in unterschiedlicher Menge Elastin, Kollagen (Typ I und III) und Grundsubstanz (Proteoglykane) vorhanden sind. Hauptaufgabe der Media ist die Regulation der Flußgeschwindigkeit.

Die Adventitia besteht aus Bindegewebe mit elastischen Fasern. In ihr verlaufen kleine Blut- und Lymphgefäße und einzelne Nervenfasern, die die Versorgung des Gefäßes von außen sicherstellen [6].

1.3 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten sind mit einem Durchmesser von 10 bis 18 µm die größten der weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Sie besitzen einen unsegmentierten Zellkern und einen relativ breiten Zytoplasmasaum, der feine Granulationen enthalten kann. Die Monozyten und Makrophagen stammen von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. In der

Monozytopoese entwickeln sich im Knochenmark aus der myeloiden Vorläuferzelle über Monoblasten und Promonozyten die reifen Monozyten [55].

Die ausgereiften Monozyten verlassen das Knochenmark und zirkulieren für 8-70 Stunden im Blutkreislauf mit einer Halbwertszeit von 15-20 Stunden. Ihre Zirkulationsdauer ist während einer Enzündungsreaktion unter anderem abhängig von Mediatoren, welche die Chemotaxis und die Diapedese an dem Ort der Inflammation vermitteln [69].

Die Monozyten differenzieren sich abhängig vom Zielgewebe in gewebespezifische Makrophagen, die dort für Monate bzw. Jahre persistieren können. Die Monozyten und Makrophagen gehören zu den Zellen der unspezifischen Immunabwehr (angeborene Immunantwort). Sie erfüllen eine wichtige Aufgabe bei der Einleitung der Immunantwort. Die Makrophagen sind außerdem stark in den Lipidstoffwechsel des Körpers eingebunden. Sie sind für die Oxidation der low-density Lipoproteine (LDL) nach deren Phagozytose verantwortlich und damit an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt [41].

1.4 Atherogenese

Wesentlich zum Verständnis der Entstehung der Atherosklerose, der Atherogenese, haben die Arbeiten von Ross beigetragen, der in den 70er Jahren die „Response to injury"-Hypothese (Verletzungstheorie) formulierte [58].

Nach dieser Vorstellung sind die Endothelzellen einer wiederholten und kontinuierlichen Schädigung durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse ausgesetzt.

An den verletzten Endothelstellen, an denen die Permeabilität gegenüber Plasmaproteinen, besonders Albumin, Fibrinogen und LDL erhöht ist, setzt das Fortschreiten der Atherosklerose ein. Die geschädigten Zellen induzieren eine unspezifische, chronische Entzündungsreaktion mit nachfolgender fibroproliferativer Antwort. Die Dysfunktion des Endothels bedingt die Bildung von Adhäsionsmolekülen, die in der Lage sind, zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten zu binden [56], [57].

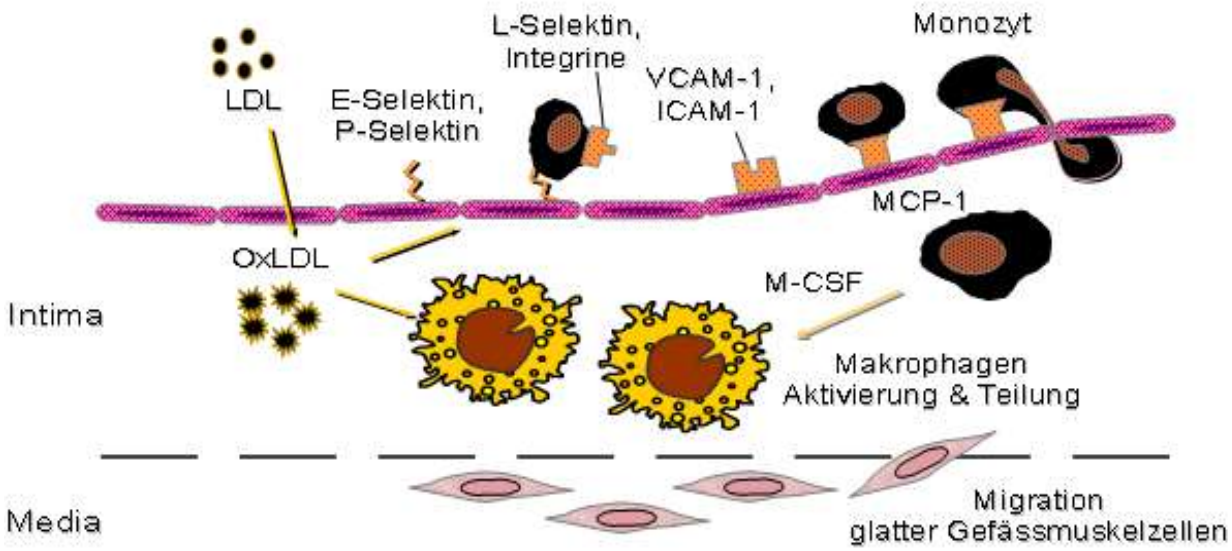


Abb. 2: Initialstadium der Atherosklerosebildung, dargestellt ist die erhöhte Permeabilität für LDL (Low Density Lipoprotein). Die Zelladhäsionsmoleküle L-Selektin, P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) spielen eine Schlüsselrolle bei der Bindung von Monozyten. Abkürzungen: OxLDL (Oxidiertes Low Density Lipoprotein), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor). Modifiziert nach Kinlay et al. J Cardiovasc Pharmacol 1998;32(suppl 3):62-66, Newby et al. Cardiovasc Res 1999;41:345-360

Maßgebliche Arbeiten der letzten Jahre betrachten die Atherogenese als einen inflammatorischen Prozess der Gefäßwand, der über Jahre und Jahrzehnte abläuft. Durch zahlreiche epidemiologische, klinische und experimentelle Untersuchungen hat sich die Erkenntnis weiterhin bestätigt, dass Entzündungsprozesse ein wesentliches Merkmal bei der Entstehung, der Progression und den Komplikationen der Atherosklerose darstellen [33], [34], [56], [57].

Dabei sind inflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten, sowie inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine involviert [32], [35].

Eine intakte Endothelschicht kann einem prolongierten Kontakt mit Monozyten und anderen Leukozyten standhalten. Wenn die Endothelzellen imflammatorisch aktiviert werden, wird eine erhöhte Anzahl von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen exprimiert. Eine entscheidende Rolle im Prozess der Atherombildung spielt VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1). VCAM-1 bindet Monozyten und T-Lymphozyten. MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) reguliert die transendotheliale Diapedese von Monozyten. M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) ist verantwortlich für die Umwandlung von Monozyten in lipidbeladene Makrophagen in der Intima [33], [41].

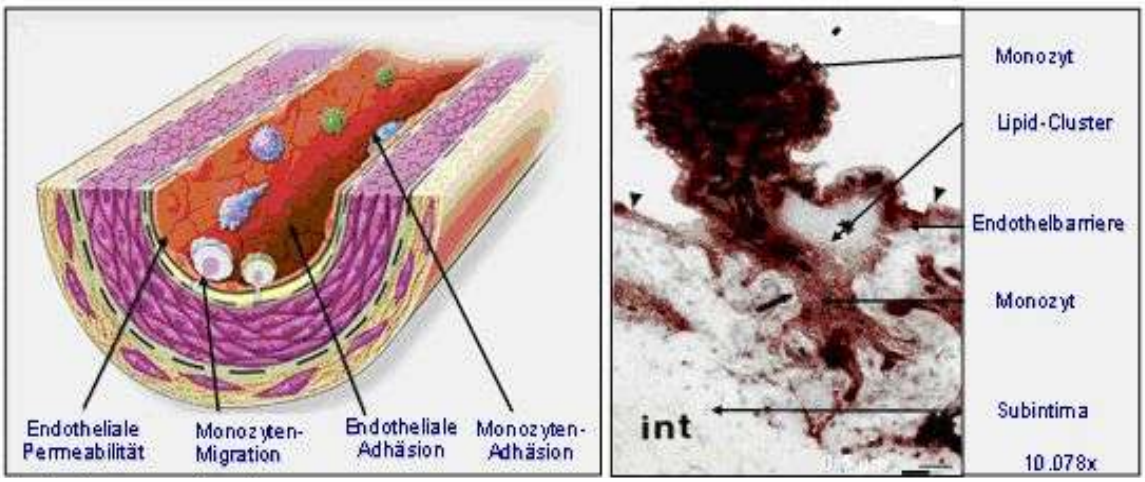


Abb. 3: Monozytenmigration: Der Prozess der Adhäsion und Migration von Monozyten durch das Endothel. Modifiziert nach Ross R, N Engl J Med 340 (1999) & Lusis AJ, Nature 407 (2000). Auf der linken Abbildung ist ein Gefäßquerschnitt dargestellt; rechts ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Monoyztenmigration gezeigt.

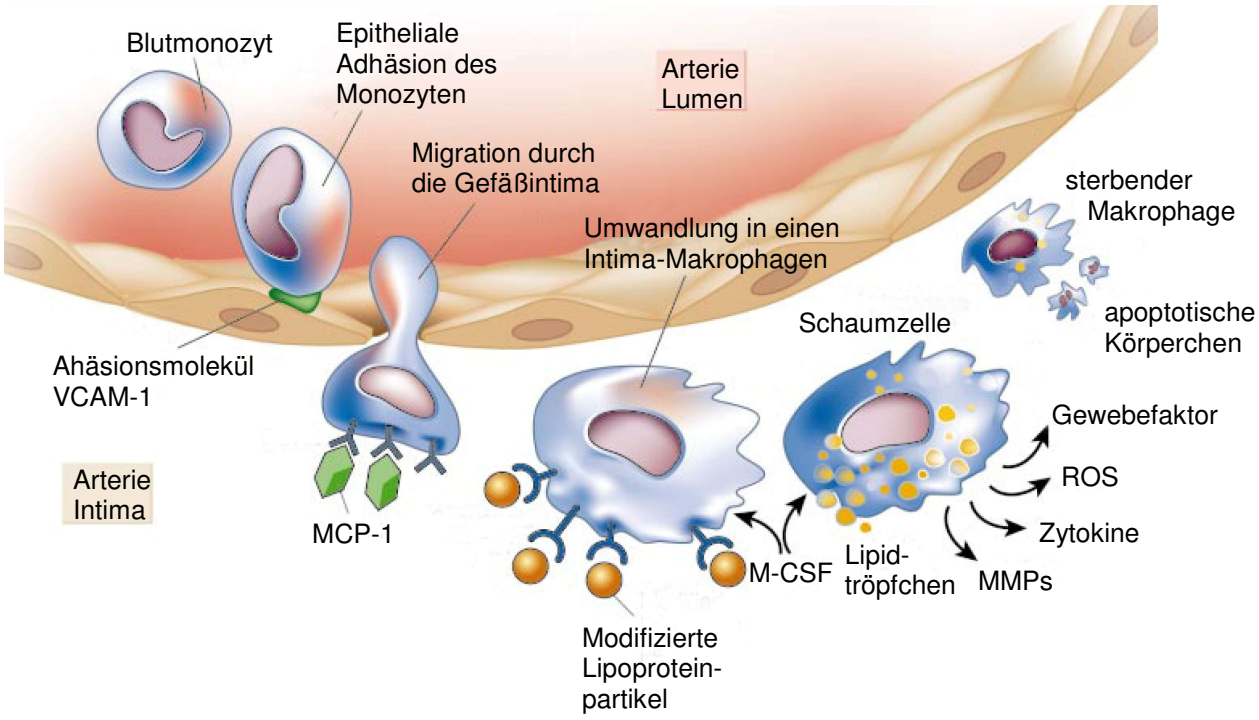


Abb.4:. Inflammation im Prozess der Artherosklerose:
Die Schemazeichnung stellt den Prozess des Anhaftens und des Wanderns der Monozyten durch die Gefäßintima dar, vermittelt durch das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1). MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) reguliert die transendotheliale Diapedese von Monozyten. Abkürzungen: M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), CCR2 (Chemokine (C-C motif) receptor 2), MMPs (Matrix metalloproteinases), ROS (Reactive oxygen species). Modifiziert nach Libby P, Nature 420:868 (2002)

Im Stadium der endothelialen Dysfunktion finden die ersten Gefäßwandveränderungen statt, die später zur Formierung der Läsionen führen. Die Adhäsion der Monozyten aus der Blutbahn und ihre Migration durch das Endothel der Intima in den subendothelialen Raum werden als ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung der frühen Atherosklerose angesehen.

Als weiterer Schritt der Atherogenese finden die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die unregulierte Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen statt. Die Makrophagen liegen nach der Lipidaufnahme als Schaumzellen diffus in der Intima vor. Die Transformation zu Schaumzellen wird durch oxidierte Low Density Lipoproteine (OxLDL) vermittelt, sowie durch M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), TNFα (Tumor necrosis factor α) und IL-1 (Interleukin-1). Es kommt zur Wanderung und Ansammlung glatter Muskelzellen in der extrazellulären Matrix der Intima. Das Gefäßlumen ist in diesem Stadium jedoch noch nicht eingeengt.

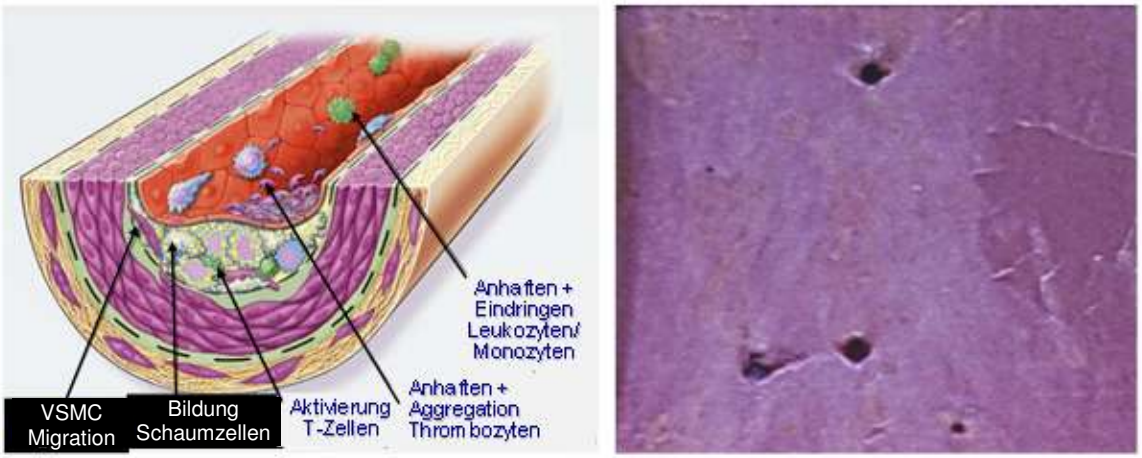


Abb. 5: Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen. Glatte Muskelzellen wandern in Richtung Intima. Modifiziert nach Ross R, N Engl J Med 340 (1999). Auf der linken Abbildung ist eine Darstellung eines Gefäßquerschnitts zu sehen; VSMC (Vascular smooth muscle cell) steht für glatte Muskelzellen. Rechts sind Fettstreifen dargestellt.

Die ersten makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Arterienwand im Sinne der Atherogenese sind die Fettstreifen. Es handelt sich um schmale, flache, gelb gefärbte, in Gefäßrichtung orientierte Gebilde, die durch subendotheliale Schaumzellaggregate, aber auch durch einige lipidbeladene glatte Muskelzellen charakterisiert sind.

Atherosklerotische Plaques, auch Atherome genannt, entstehen in der Intima und sind durch einen Lipidkern und eine Atheromkappe charakterisiert. Der Lipidkern besteht histologisch aus Lipidtropfen, Zelltrümmern und Schaumzellen. Die Atheromkappe setzt sich aus glatten Muskeln, Kollagen, elastischen Fasern und Proteoglykanen zusammen und überzieht das Zentrum. Dieses Zentrum kann auch Zeichen des Zelltods aufweisen, bedingt durch Apoptose, Nekrose, erhöhte proteolytische Aktivität und Lipidanhäufung. An den Rändern der Plaquekappe befinden sich Makrophagen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten. Die Makrophagenansammlung wird durch eine Reihe von begünstigenden Faktoren wie MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), OxLDL (Oxidiertes Low Density Lipoprotein) und M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) begünstigt.
Die Intimastruktur wird an der betroffenen Stelle aufgelöst und eine Arterienwandverdickung lässt sich abzeichnen. Solange die Plaquekappe intakt ist, besteht keine akute thrombotische Gefahr.

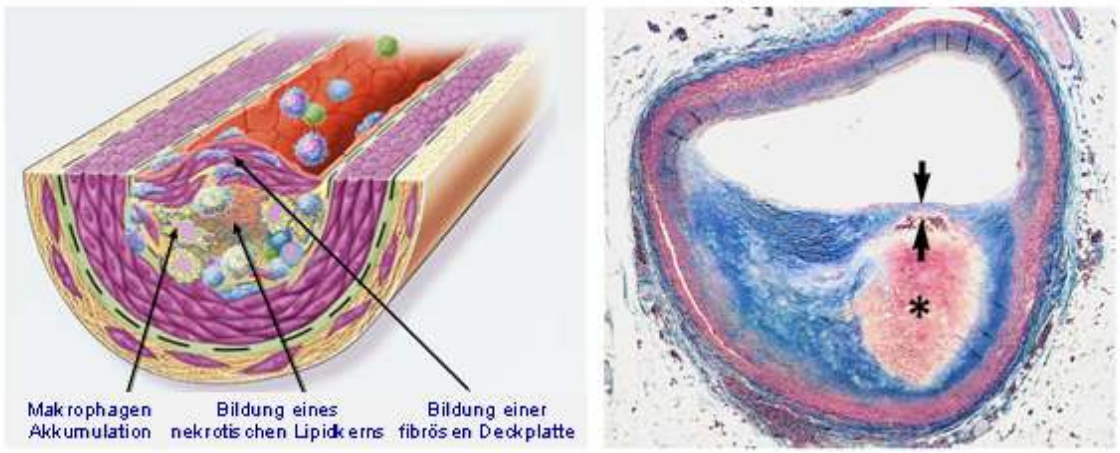


Abb. 6: Plaquebildung mit stabiler Deckplatte (Kappe), modifiziert nach Ross R, N Engl J Med 340 (1999) & Falk et al., Circulation 92 (1995). Links ist ein Gefäßquerschnitt dargestellt; rechts ist eine stenosierte Koronararterie mit Plaque abgebildet.

Fibroatherome stellen eine Sonderform dar und sind Plaques, gebildet aus mehreren Lipidkernen, die durch fibröses Gewebe voneinander getrennt sind.
Nach Stary werden die Läsionen der Plaques histologisch in drei Formen unterteilt: Ulzerationen, plaqueoberflächliche Hämatome und Thromben [61].

Komplizierte Läsionen entstehen, wenn sich Risse an der Oberfläche der Atherome bilden und dadurch die Gerinnungskaskade aktiviert wird. Es bilden sich Thromben, so dass es binnen kürzester Zeit zu einem subtotalen oder totalen Verschluss des Gefäßes kommen kann [28], [51].

Die stabile Läsion ist durch eine dichte und regelmäßig dicke Plaquekappe gekennzeichnet. Bei geringem Fettgehalt dominieren die fibrotischen Anteile, so dass das Atherom einer fibrösen Plaque (stabile Plaque) entspricht.

Eine Läsion wird als instabil bezeichnet und gilt als besonders risikoreich, wenn sie viele Makrophagen-Schaumzellen enthält und nur eine dünne fibröse Kappe aufweist [67]. Die Struktur der instabilen Plaque ist gekennzeichnet durch einen geringen Kollagengehalt, hohen Gehalt an Lipiden und wenig glatten Muskelzellen sowie hoher Aktivität von, die fibröse Kappe destabilisierenden, Matrixmetalloproteinasen. Plaquerupturen und Plaqueerosionen werden durch Endotheldysfunktion sowie durch mechanische Faktoren gefördert [28], [33], [36], [39], [45].

1.5 Alkohol

Ethanol (chemische Summenformel C_2H_5OH oder C2H6O) ist eine farblose, leichtentzündliche, stechend riechende Flüssigkeit. Auf natürlichem Weg entsteht Ethanol bei der Vergärung zuckerhaltiger Früchte. Heute wird er hauptsächlich durch Gärung aus Biomasse gewonnen. Ethanol kann im gesamten Verdauungstrakt resorbiert werden und etwa 1-2 Stunden nach dem Alkoholkonsum erreicht die Konzentration im Blut ihren maximalen Wert. Die Alkoholaufnahme wird durch durchblutungssteigernde Faktoren wie zum Beispiel Wärme, Zucker und Kohlenstoffdioxid erhöht. Fett verlangsamt die Aufnahme, führt aber nicht zu einer geringeren Gesamtresorption des Alkohols, sondern lediglich zu einer zeitlichen Verzögerung. Die Alkoholresorptionsrate ist außerdem von weiteren Faktoren, wie Alkoholmenge, Alkoholkonzentration, Trinkgeschwindigkeit und Füllungszustand des Magens bzw. Zusammensetzung des Speisebreis, abhängig.

In der Leber wird der Alkohol durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd abgebaut. Bei höherer Alkoholkonzentration oder bei chronischen Trinkern wird der Alkohol zusätzlich über das mikrosomale Ethanol oxidierende System (MEOS) durch ein Cytochrom P450-Enzym abgebaut [42]. Die Abbaurate ist innerhalb gewisser

Grenzen konstant und beträgt bei Männern 1g Alkohol je 10kg Körpergewicht pro Stunde und bei Frauen etwa 0,85g pro 10kg Körpergewicht pro Stunde [29].

Die Abbauzeiten von Alkohol bei Männern und Frauen variieren aufgrund von Unterschieden im Verhältnis zwischen Körperfett und Körperwasser sowie in der Menge der Alkoholdehydrogenase.

In einem vom Bundesministerium für Gesundheit initiierten Forschungsprojekt zum Thema „Alkoholkonsum und Krankheiten“ wurden die tolerierbaren oberen Alkoholzufuhrmengen (TOAM) erarbeitet. Die TOAM liegen für den erwachsenen Mann bei 20-24g Alkohol pro Tag und für die erwachsene Frau bei 10-12g Alkohol pro Tag [13]. Jedes Organ des menschlichen Körpers reagiert unterschiedlich auf Alkohol und kann dosisabhängig geschädigt werden. Um keinerlei alkoholassoziierte Störungen zu riskieren und mögliche Schädigungen zu verhindern sollte die Schwellendosis eingehalten werden. Neben den alkoholbedingten Risiken wird der alkoholassoziierte Nutzen diskutiert. Der präventive Charakter des Alkohols ist nur in der risikoarmen Schwellendosis gegeben und praktisch ausschließlich auf eine Kardioprotektion zurückzuführen.

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen medizinischen Gesellschaften Schwellendosen im Umgang mit Alkohol publiziert. Diese Empfehlungen variieren international aber auch deutschlandweit stark. Beispielsweise definiert die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eine Alkoholzufuhr in Höhe von 20g pro Tag für Männer bzw. 10g pro Tag für Frauen als Höchstmenge für einen gesundheitlich verträglichen Alkoholkonsum [20].

Das Robert Koch Institut berichtet, dass Deutschland im europäischen Vergleich zu den Ländern mit dem höchsten Alkoholverbrauch gehört. Nur in Luxemburg, Irland, Portugal und Frankreich wird mehr Alkohol konsumiert. So wurde für das Jahr 2005 ein Pro-Kopf-Verbrauch an alkoholischen Getränken in Höhe von 144,6 Litern deutschlandweit berechnet [44]. Dies entspricht einer Menge von 10,0 Litern reinem Alkohol bzw. Ethanol pro Einwohner.

Auswirkungen von Alkohol auf Herz, Gefäße und somit Beeinflussung der Arteriosklerose werden kontrovers diskutiert. Aktuell wird angenommen, dass die Beziehung zwischen Alkoholkonsum und der koronaren Herzerkrankung J-, U- oder L- förmig ist. Der protektive Effekt eines moderaten Alkoholkonsums lässt sich pathophysiologisch plausibel

erklären. Unklar bleibt, ob Wein, Bier und Spirituosen unterschiedlich wirken und ob die Art und Weise wie Alkohol konsumiert wird eine Rolle spielt.

In den 70-er Jahren wurde beobachtet, dass speziell die Bewohner Südfrankreichs mit ihrem hohen Rotweinkonsum einen Gesundheitsvorteil gegenüber Nordeuropäern besitzen. Trotz der traditionellen fettreichen Gerichte leiden sie viel seltener unter Herz- oder Gefäßerkrankungen. Seither genießt der Rotwein ein Image als Gesundheitselixier. Dieses Phänomen wird als das „französische Paradoxon“ bezeichnet. Wissenschaftliche Beobachtungen und Experimente zeigten, dass die Polyphenole (eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen) dem Rotwein eine protektive Wirkung verleihen [17].

Polyphenole sind aromatische Verbindungen und kommen in Pflanzen als bioaktive Substanzen wie Farbstoffe (Flavonoide), Geschmacksstoffe und Gerbsäuren vor. Viele Polyphenole gelten als gesundheitsfördernd, entzündungshemmend und krebsvorbeugend. Darüber hinaus werden den Polyphenolen antioxidative und gefäßerweiternde Wirkungen, sowie auch antimigratorische und antiproliferative Effekte zugeschrieben [12], [14], [60], [64], [66].

Flavonoide schützen die Körperzellen vor freien Radikalen und verlangsamen die Zelloxidation. Sie vermindern die Fettablagerungen und damit die Plaquebildung in den Blutgefäßen. Auf diese Art wird eine protektive Wirkung im Bezug auf die Atherosklerose postuliert [3], [14], [52].
Außer Ethanol sind möglicherweise weitere Inhaltstoffe im Rotwein, wie zum Beispiel die Phenole Resveratrol oder Quercetin, für seine besonders günstige Wirkung verantwortlich. Hinweise auf günstige biologische Wirkungen dieser Stoffe im Wein im Bezug auf die Atherosklerose fanden sich in vielen experimentellen Studien [8], [18], [50].
Resveratrol ist ein Antioxidans, das ebenfalls zur Gruppe der Polyphenole gehört. Es findet sich in großen Mengen in der Haut der roten Weintrauben, daher enthält Rotwein im Gegensatz zu Weißwein und Roséwein höhere Konzentrationen an Resveratrol. In mehreren Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass Resveratrol in akuten sowie auch in chronischen Situationen die myokardiale Schädigung während der ischämischen Phase eines kardialen Ereignisses reduziert. Als weitere Effekte werden die Verminderung der LDL-Oxidation, der Inflammation, der Thrombozytenaggregation und damit der Thrombusbildung beschrieben. Effekte von Resveratrol finden sich bei der zellulären Signaltransduktion, Apoptose, und der Genexpression. Weiterhin beeinflusst Resveratrol

mehrere Faktoren, die Tumorwachstum und -progression bestimmen können. Ein erwiesener Mechanismus ist die Hemmung des Nukleären Faktors kappa B (NF-κB) durch Resveratrol. NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der die Transkription vieler proinflammatorischer Enzyme und Mediatoren steuert. NF-κB ist assoziiert mit Imflammation und Immunantwort sowie der Regulation von Zellproliferation und Apoptose. Diese Eigenschaften bestimmen die Schlüsselrolle von NF-κB für die Tumorentstehung sowie für andere Pathologien, inklusive der Atherosklerose [5], [16], [19], [24], [68].

Ein geringer bis mäßiger Alkoholkonsum ist mit einer verminderten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert. Dieser günstige Effekt alkoholischer Getränke wird nach derzeitigen Erkenntnissen vor allem durch eine atheroprotektive Veränderung des Fettstoffwechsels bzw. durch eine Beeinflussung der Hämostase erklärt [8], [25], [53].
Nicht zu vernachlässigen sind Unterschiede im Ernährungsverhalten bei den Populationen von Bier- und Weintrinkern. Bei der Analyse von mehr als 3,5 Millionen Kassenbons in dänischen Supermärkten konnten deutliche Differenzen in der Nahrungsmittelauswahl erkannt werden. In den Einkaufskörben der Weinkäufer waren sehr viel häufiger Bestandteile einer als günstig angesehenen mediterranen Diät wie bespielsweise Oliven, Olivenöl, Gemüse und Salate zu finden. Biertrinker haben im Gegensatz dazu häufiger Wurst, Fleisch, Eier, Butter, Ketchup und Softdrinks eingekauft. Möglicherweise kann dadurch ein Teil der Unterschiede in den Mortalitätsraten von Wein- und Biertrinkern erklärt werden [27].
Ungeklärt bleibt die Frage, ob der Ethanolgehalt, der Gehalt an anderen Inhaltsstoffen oder deren Kombination entscheidend für die hemmende Wirkung alkoholhaltiger Getränke auf atherosklerotische Prozesse ist [54].

Die Wirkung moderaten Alkoholkonsums auf die im Rahmen der frühen Atherogenese beobachtete endotheliale Monozytenmigration ist bislang nicht systematisch untersucht worden. Offen ist außerdem die Frage ob die unterschiedlichen alkoholischen Getränke eine differente Wirkung auf die Monozytenwanderung ausüben.

1.6 ICAM-1

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) gehört zur Familie der Immunglobuline. Diesen Adhäsionsmolekülen wird die Regulation der Anheftung und der transendothelialen Migration von Leukozyten zugeschrieben [1]. Zirkulierende Leukozyten heften sich nicht an ein normales Endothel an, aber kurz nach einer atherogenen Stimulation, beginnt das verletzte Endothel mit der Expression von Adhäsionsmolekülen, die dann selektiv die zirkulierenden Leukozyten binden [10]. ICAM-1 wird nicht nur von Endothelzellen exprimiert, sondern auch von Leukozyten selbst, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und vielen anderen nichtkardialen Zelltypen [49]. Man geht davon aus, dass Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen und zur Plaqueruptur beitragen [11].

1.7 E-Selektin

Zu den zirkulierenden systemischen Inflammationsmarkern, die das Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Krankheitsereignisse, wie Myokardinfarkt, Apoplex und periphere arterielle Verschlusskrankheit vorhersagen können, zählt auch E-Selektin [40], [65]. E-Selektin ist ein endotheliales zellspezifisches Selektin, das ebenfalls zu den Adhäsionsmolekülen gezählt wird. Es stabilisiert die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen durch die Förderung von Zell-Zell-Verbindungen. E-Selektin wird nur im Rahmen inflammatorischer Stimuli exprimiert, nicht aber von normalen Endothelzellen [2]. Die initiale Anheftung der neutrophilen Leukozyten an das vaskuläre Endothel wird durch vorrübergehende Interaktionen zwischen E-Selektin und den glykosilierten Rezeptoren der Endothelzelle vermittelt [9]. Die nachfolgende feste Anheftung wird dann durch das oben erwähnte ICAM-1 vermittelt. Die löslichen Formen beider Adhäsionsmoleküle (E-Selektin und ICAM-1) wurden in Plasma und in Gewebekulturen menschlicher Zytokin-stimulierter Endothelzellen nachgewiesen und werden als Marker für zelluläre Expression angesehen [21], [48].

1.8 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Beeinflusst moderater Konsum von alkoholischen Getränken das Migrationsverhalten von Monozyten bei gesunden Probanden?

2. Wird das Migrationsverhalten durch Ethanol oder andere Inhaltstoffe wie Polyphenole beeinflusst?

3. Verändert sich das Migrationsverhalten der Monozyten in Abhängigkeit von der Art des (alkoholischen) Getränkes?

2 Material und Methode

2.1 Überblick

Die Studie wurde als kontrollierte, randomisierte und einfach verblindete Interventionsstudie durchgeführt. Die Studienpopulation setzte sich aus insgesamt 42 Männern und Frauen im Alter von 23 bis 56 Jahren zusammen.

2.1.1 Studienkollektiv

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über Aushänge an der Universität Ulm, sowie über Annoncen in der örtlichen Presse. Unabhängig von dem oben genannten Studienkollektiv für die Interventionsversuche, wurden für die Studie zusätzlich freiwillige Blutspender der Blutspendezentrale Ulm für die in vitro Versuche aquiriert.
Potentielle Probanden wurden zunächst im Rahmen vorher festgelegter Kriterien überprüft:

- Einschlusskriterien:

Die Probanden mussten der Randomisation in die Interventionsgruppen zustimmen, zwischen 20 und 60 Jahre alt, Nichtraucher und gesund sein.

- Ausschlusskriterien:

Ausgeschlossen wurden die Probanden, die der Randomisation nicht zustimmten. Studienausschluss erfolgte auch bei fehlender schriftlicher Versicherung, nach Konsum der alkoholischen Getränke mindestens 8 Stunden am Straßenverkehr nicht teilzunehmen oder Tätigkeiten auszuüben, bei denen durch Alkoholkonsum Sicherheitsgefahren auftreten könnten. Probanden mit Hinweisen auf mögliche Suchtgefahr (Eigen- oder Familienanamnese einer Alkoholkrankheit, Eigenanamnese einer anderen Suchterkrankung) und auf jegliche psychiatrische Erkrankung wurden ebenso ausgeschlossen. Wir führten eine klinische und laborchemische Untersuchung auf schwere Erkrankungen innerer Organe, insbesondere Einschränkungen der Leber- oder Nierenfunktion. Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse einschließlich Diabetes mellitus und Herzkreislauferkrankungen erweiterten die Ausschlusskriterien.

Die Probanden durften unter keinem akuten Infekt, einer chronischen entzündlichen Erkrankung (z.B. rheumatoide Arthritis, chronische Bronchitis etc.) oder einer Allergie gegen die Interventionsstoffe leiden.
Eine Dauerbehandlung mit Medikamenten (ausgenommen waren orale Antikonzeptiva, Schilddrüsenhormone, Jod und Nahrungsergänzungsmittel) und eine Schwangerschaft galten als Ausschlussgrund.
Es durfte keine Erkrankung vorliegen, die eine Teilnahme über den gesamten Studienzeitraum unmöglich gemacht hätte.
Außerdem führte jeder Umstand, der nach Meinung des Rekrutierenden die Untersuchung der Effekte und die Sicherheit beeinträchtigen würde, zum Ausschluss.

2.1.2 Studienablauf

Die Probanden wurden in sechs Gruppen randomisiert. Es erfolgte eine Gruppenverteilung in eine Gruppe mit Rotwein (Alkoholgehalt 12,5%), eine mit Bier (Alkoholgehalt 5,6%) und eine mit niedrigprozentiger Ethanollösung (Alkoholgehalt 12,5%). In den vergleichbaren Gruppen wurden derselbe Rotwein und dasselbe Bier in jeweils entalkoholisierter Form konsumiert. Die Kontrollgruppe nahm während der Intervention nur Wasser zu sich.
Die Alkoholmenge entsprach ca. 30g Alkohol pro Tag für Männer und ca. 20g Alkohol für Frauen. Die Probanden wurden nach Geschlecht und in Altersgruppen von 23 bis 37 und von 37 bis 56 Jahre geschichtet. Nach Einschluss der Probanden stand am Beginn eine mindestens zweiwöchige Phase mit Alkoholabstinenz. Anschließend erfolgte die Intervention gemäß der zufällig zugeordneten Gruppe mit alkoholischen oder nichtalkoholischen Getränken.
Zu Beginn und am Ende jeder Phase wurden Blutuntersuchungen sowie eine Befragung anhand eines Fragebogens durchgeführt.

Zeitplan:
Zeitpunkt T0:
Einschluss der Probanden durch Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien; Beginn der mindestens zweiwöchigen Phase ohne Alkoholkonsum
Zeitpunkt T1:
Überprüfung der Ausschlusskriterien (eventuell neu aufgetretene); Beginn der dreiwöchigen Intervention

Zeitpunkt T2:
Ende der Interventionsphase

Interventionsgetränke:
Gruppe 1: **Bier** (Alkoholgehalt 5,6%)
Männer 2 x 330 ml/Tag; Frauen 1 x 330 ml/Tag

Gruppe 2 : **alkoholfreies Bier**(Alkoholgehalt <0,3%)
Männer 2 x 330 ml/Tag; Frauen 1 x 330 ml/Tag

Gruppe 3 : **Rotwein**(Alkoholgehalt 12,5%)
Männer 300 ml/Tag ; Frauen 200 ml/Tag

Gruppe 4: **entalkoholisierter Rotwein**(Alkoholgehalt <0,3%)
Männer 300 ml/Tag ; Frauen 200 ml/Tag

Gruppe 5 : **Ethanol**(Alkoholgehalt 12,5%)
Männer 300 ml/Tag ; Frauen 200 ml/Tag

Gruppe 6: **Wasser**
Männer 300 ml/Tag ; Frauen 200 ml/Tag

2.1.3 Fragebogen

Sämtliche Teilnehmer wurden zu Beginn der Studie mittels strukturierter Fragebögen interviewt. Der Inhalt des Fragebogens umfasste soziodemographische Merkmale, Fragen zum Freizeitverhalten und zur körperlichen Aktivität. Die Probanden mussten diese Fragen jeweils mit Stundenangaben pro Woche quantifizieren.
Darauf folgten Fragen zur Krankengeschichte. Es wurde nach Angina pectoris, peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), einer Herzinsuffizienz, einer Nierenerkrankung, Bronchialasthma, chronischer Bronchitis, chronischer Polyarthritis und Arthrose, einer Krebserkrankung, einer Lebererkrankung, einer Gallenblasenerkrankung, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und nach Hypercholesterinämie gefragt. Diese Fragen bezogen sich auf die zum Zeitpunkt des Interviews zurückliegenden 12 Monate. Weiter eruierten wir einen stattgehabten Herzinfarkt, Apoplex und eine Hepatitis. Abschließend

zur Krankengeschichte wurde nach einem innerhalb der letzten vier Wochen aufgetretenen grippalen Infekt, nach Husten, Auswurf, eitriger Bronchitis, Fieber und einer durchgeführten Operation gefragt.
Daraufhin mussten die Probanden Fragen zum Essverhalten und zu Genussmitteln -jeweils mit konkreten Mengenangaben- beantworten.
Die weiblichen Probanden wurden noch zusätzlich nach der Anzahl bereits durchgemachter Schwangerschaften befragt, sowie nach einer aktuell zum Zeitpunkt des Interviews bestehenden Schwangerschaft. Die Einnahme der hormonellen Antikonzeption und der Einnahmezeitraum, angegeben in Jahren, wurden ebenfalls erfragt.
Das Rauchverhalten wurde nicht nur auf den aktuellen Stand hin abgefragt, vielmehr wurde auch ein zurückliegender Nikotinabusus quatitativ erfragt.
Das Trinkverhalten wurde zum einen quatitativ anhand der Trinkmenge am Wochenende evaluiert. Zum anderen wurde auch eine genaue Erhebung der Alkoholmengen an Werktagen durchgeführt. Die Mengenangaben erfolgten auf 0,5l genau bei Bier und Alkopops, auf 0,2l genau bei Wein und Sekt und auf 2cl genau bei Schnaps.
Danach wurde das allgemeine Trinkverhalten bei gesellschaftlichen Anlässen erfragt. Das Gewicht und die Körpergröße wurden erfragt. Abschließend wurde nach den in den letzten zwei Wochen eingenommenen Medikamenten gefragt.
Nach standardisierter Befragung am Ende der Interventionsphase wurden erneut die Medikamenteneinnahme und eventuell neu aufgetretene Krankheiten erfragt.
Ziel dieser ausführlichen Befragung war die Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie die Identifikation weiterer potentieller Störgrößen, insbesondere das Auftreten von akuten Erkrankungen wie beispielsweise Infekte, die das Ergebnis beeinflusst hätten.

2.1.4 Blutabnahme

Die Blutabnahmen erfolgten bei Raumtemperatur, im Anschluss an die 20-minütige Befragung am sitzenden Probanden. Die Blutabnahmen fanden im nüchternen Zustand statt (mindestens 6 Stunden postprandial).
Nach kurzzeitiger Stauung wurde mit einer Butterfly Nadel (G21 0,8 grün oder G19 1,1 creme; Safety-Multifly-Set, Fa. Sarstedt) punktiert und mit geringem Sog venöses Blut in 3 Spritzen (3 x 20ml; Fa. B.Braun) entnommen. In jeder Spritze wurden vor der Blutabnahme 0,2 ml Heparin aufgezogen. Bei jeder Sitzung betrug die entnommene Blutmenge 60 ml und wurde sofort in unserem Labor weiterverarbeitet.

2.2 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut

Vor Beginn der Isolation wurden Lymphozyten-Separationsmedium und Phosphate buffered saline (PBS) für ca. 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Für die Blutprobe von 60ml heparinisiertem Blut wurden drei Leukosep-Isolationsröhrchen benötigt. In jedes wurde nach Erwärmung des Mediums 15ml Lymphozyten-Separationsmedium gegeben. Anschließend wurde zentrifugiert (2300 Umdrehungen pro Minute (U/min), 1 Minute, Raumtemperatur). Die Leukosep-Isolationsröhrchen besitzen in der Mitte eine Filterscheibe. Durch die Zentrifugation ergaben sich die folgende Schichten: unterhalb der Filterscheibe- das Lymphozyten-Separationsmedium und Erythrozyten und oberhalb der Filterscheibe von unten nach oben- das Lymphozyten-Separationsmedium, die mononukleären Zellen als gemischte Fraktion und Plasma. Mit der Hilfe einer Ficoll-Gradientenzentrifugation wurde eine Trennung der mononukleären Zellen von den Erythrozyten erreicht. Die sich ausbildenden Phasen durften sich dabei nicht mischen, da sich sonst der erforderliche Dichtegradient beim Zentrifugieren nicht ausgebildet hätte. Der Plasma-Ring wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgesaugt, ohne die benachbarten Phasen zu aspirieren.

Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS (Puffer mit Kalzium und Magnesium) gemischt und zentrifugiert (1200 Umdrehungen pro Minute, 10 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend in einer Percoll-Lösung (mit HANKS auf pH 7,2 titriert) gelöst. Dadurch erfolgte eine weitere Auftrennung. Das Pellet wurde in einer Lösung von 7ml Percoll und 3ml HANKS resuspendiert und erneut zenrifugiert (Drehzahl 2, 30 Minuten, Raumtemperatur, ohne Bremse).

Die entstandene leukozytäre Interphase wurde abpipettiert und mit PBS resuspendiert und zentrifugiert (1200 Umdrehungen per Minute, 10 Minuten, Raumtemperatur). Das verbliebene Pellet wurde in 11ml RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute) mit 1% humanem Serum in eine sterile Petrischale pipettiert und über Nacht bei 37ºC inkubiert. Dabei haben die Monozyten auf den Plattenboden adhäriert.

2.3 Migration der Monozyten

Die Migrationsversuche wurden am Vortag vorbereitet. Die Migrationskammer wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Der Filter (Nucleopore Track-Etch Membrane) wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit Kollagen beschichtet. Am Tag des Migrationversuchs wurde als erstes der Filter aus dem Kollagen genommen und an der

Luft für ca. eine halbe bis zu einer Stunde zum Trocknen aufgehängt. RPMI wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Monozyten nach der Adhärenzzeit in der Lösung gut gemischt und 10µl der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es erfolgte das Auszählen der isolierten Monozyten unter dem Mikroskop, um die Menge der benötigten Verdünnungslösung (RPMI-Medium) auszurechnen.
Für den Migrationsassay wurden 2 Millionen Monozyten pro 1ml Medium eingesetzt. Die Monozyten wurden stimuliert, in die Chemotaxiskammer pipettiert und 3 Stunden inkubiert.

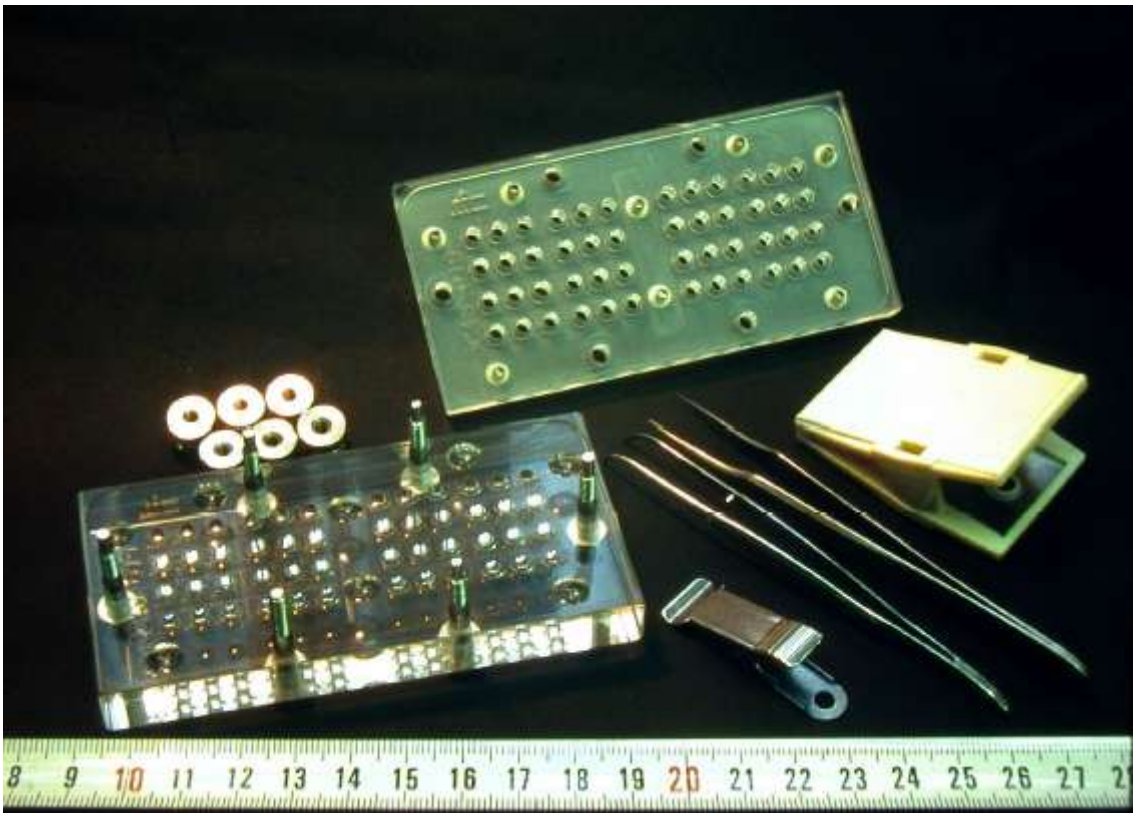


Abb. 7: Chemotaxiskammer mit speziellem Zubehör
Photo der zerlegten Chemotaxiskammer mit speziellem Zubehör wie Pinzetten und Klammern für den Filter. Der untere Teil der Kammer enthält 48 Vertiefungen. Jede einzelne dieser Vertiefungen kann mit einer Probe gefüllt werden. Dann wird ein Filter aufgelegt, welcher alle 48 Vertiefungen bedeckt, gefolgt von der Auflage einer Silikonabdichtung. Nun wird der obere Teil der Chemotaxiskammer aufgesetzt und damit die oberen 48 Einzelkammern gebildet. Alle Teile werden durch Anziehen der 6 Rändelschrauben zusammengehalten. Nach der Inkubation werden diese Rändelschrauben wieder gelöst und der obere Teil der Kammer und die Silikondichtung entfernt. Jetzt kann der Filter entnommen werden. Die nicht migrierten Monozyten auf der Oberfläche des Filters werden entfernt und die Monozyten, die durch den Filter gewandert sind, ausgezählt.

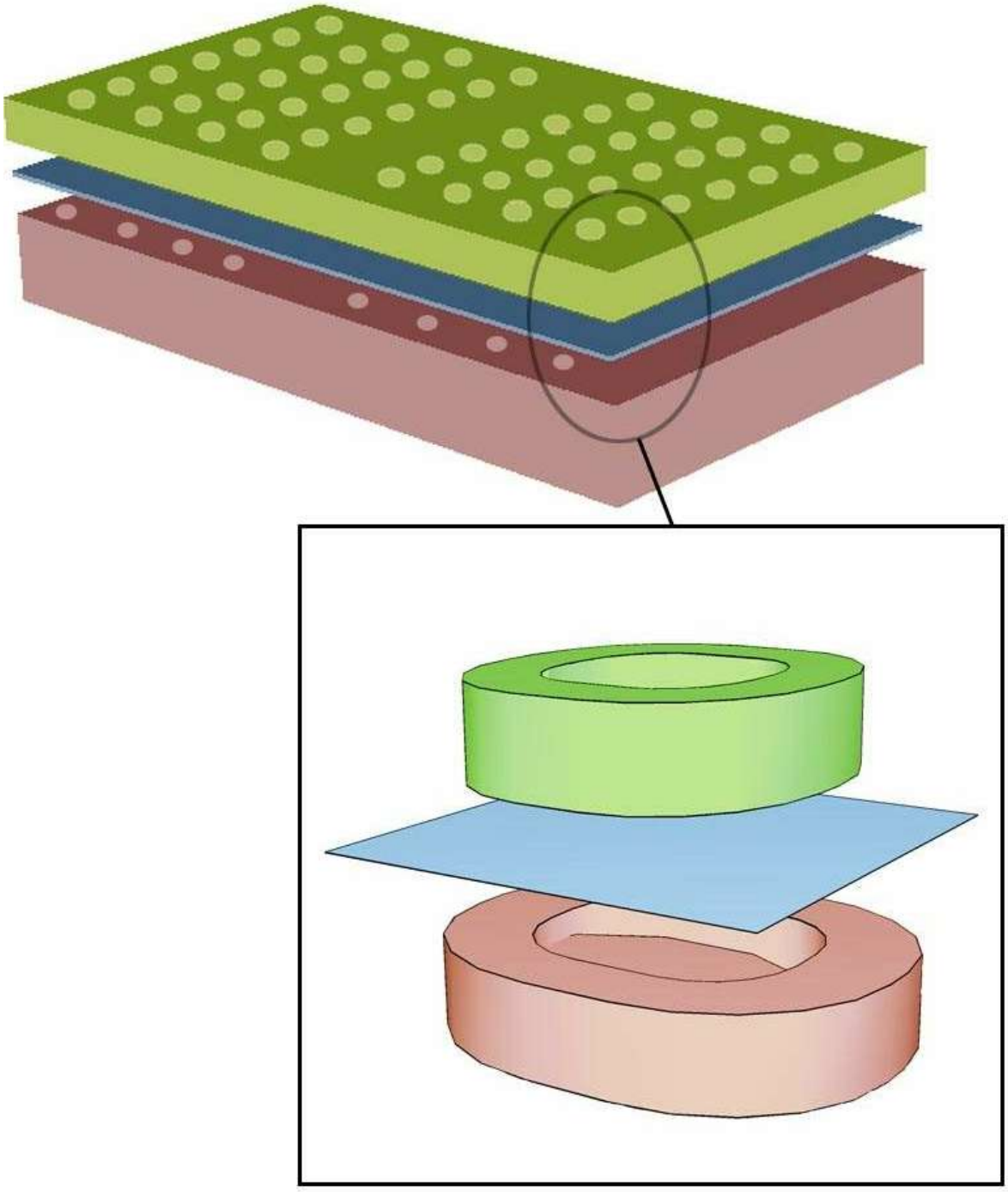


Abb. 8: Schematische Darstellung von einer Chemotaxiskammer
Diese Zeichnung stellt eine schematische Darstellung einer Chemotaxiskammer und eine separate Aufzeichnung der einzelnen Kammervertiefung dar. Zwischen dem oberen und unteren Kammerteil liegt der Filter. Jede einzelne Vertiefung kann mit einer Probe gefüllt werden und die Zellen wandern durch den Filter.

Bei den durchgeführten Migrationsexperimenten wurden als Standard-Zellstimulantien MCP1 (Monocyte chemotactic protein-1) und FMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) verwendet. Das Protein MCP-1 wird vermehrt auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. MCP-1 reguliert die Adhäsion und insbesondere die transendotheliale Diapedese von Monozyten und steuert damit inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand. Das chemotaktische Peptid *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), ein Prototyp des *N*-formyl Peptids, hat unspezifische zellaktivierende Eigenschaften.

Die Endkonzentrationen 1nM MCP-1 und 0,1mM FMLP wurden zu jeweils 1ml RPMI-Medium zugegeben. Als Negativkontrolle wurde RPMI ohne zugesetzte Proteine verwendet. Als nächstes wurden die Vertiefungen der Grundplatte der Migrationskammer gefüllt (28,5µL pro Loch). Nach Auflegen des Filters mit seiner rauen Oberfläche (der Filter ist durch eine raue und eine glatte Oberfläche gekennzeichnet) nach unten wurden die Gummidichtung und die Deckplatte aufgelegt und mit den Schrauben festgezogen. In die oberen Vertiefungen wurde je 45,5µL der präinkubierten Zellsuspension pipettiert. Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden, da sonst keine Migration hätte stattfinden können. Die stimulierten Monozyten wurden 3 Stunden bei 37ºC inkubiert. In dieser Zeit wanderten die Zellen entlang des chemotaktischen Gradienten nach unten durch die Filterporen hindurch auf dessen raue Seite. Die raue Oberfläche sollte das Anheften der Monozyten an den Filter erleichtern.

Um in diesem Experiment möglichst physiologische Bedingungen zu erreichen, durften die Temperatur des Lösungsmittels, des Mediums und der Zentrifuge 20ºC nicht unterschreiten.

2.4 Verwendete Reagenzien

Tab. 1 Auflistung der Substanzen, Lösungsmittel, Hersteller und Lieferfirmen

Substanzen und Lösungen	**Hersteller, Lieferfirmen**
Aqua bidest	Delta-Pharma, Deutschland
Kollagen	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Deckmedium	Vitro-Clud, Deutschland
Eosin	Baxter Diagnostics, Schweiz
Ethanol	Fluka, Italien
FMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)	Sigma Diagnostics, USA
HANKS	Sigma Diagnostics, USA
Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Lymphozyten Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Methanol	Fluka, Italien
MCP1(Monocyte chemotactic protein-1)	Sigma Diagnostics, USA
PBS	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Percoll	Sigma Diagnostics, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Österreich
RPMI - Medium mit 1 % humanem Serum	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Thiazin	Baxter Diagnostics, Schweiz

2.5 Geräte und Kits

Tab. 2 Auflistung der Geräte, Kits, Hersteller und Lieferfirmen

Geräte und Kits	**Hersteller,Lieferfirma**
Chemotaxiskammer mit speziellem Zubehör	Neuro Probe, USA
Deckplättchen	Marienfeld, Deutschland
Filter/ Nucleopore Track-Etch Membrane	Whatman, England
Laminar Air Flow Bench	Heraeus, Deutschland
Leukosep-Isolationsröhrchen	Greiner bio-one, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Deutschland
Objektträger	Glasbläserei Ulm, Deutschland
Pipetten	Gilson, Frankreich
Reagenzgläser	Greiner bio-one, Deutschland
Reaktionsgefäße 15ml/50ml	FALKON, Becton Dickinson, USA
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Deutschland
Zellinkubator	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge	Varifuge 3.0, Heraeus, Deutschland

2.6 Färbemethode

Nach der dreistündigen Inkubationszeit wurde der Filter, auf dem sich die migrierten Monozyten befanden, für 10 Minuten in Methanol mit seiner rauen Seite nach oben fixiert und anschließend mit Eosin (1,5 Minuten) und Thiazin (3,5 Minuten) angefärbt. Anschließend wurde der Filter in destilliertem Wasser gewaschen und mit seiner rauen Seite nach unten auf einen vorher mit 70% Ethanol gereinigten Objektträger gelegt. Die nun nach oben zeigende glatte Seite des Filters wurde vorsichtig abgewischt. Dadurch wurden die Zellen entfernt, die zwar auf dem Filter saßen, aber nicht durch ihn gewandert waren. Dann erfolgte das Befestigen des Filters auf den Objektträger mit Deckglas und Deckmedium. Das gefertigte Präparat trocknete über Nacht bei Raumtemperatur und konnte am nächsten Tag ausgewertet werden.

2.7 Auswertung

Die Auswertung der Migrationsexperimente erfolgte lichtmikroskopisch. Nach der „5 Felder Methode“ wurden jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder mit Zellen von dem nicht stimulierten, von dem MCP1-stimulierten und dem FMLP-stimulierten Bereich ausgezählt. Dabei wurden nur die morphologisch intakten Monozyten ausgezählt. Anschließend wurde ein Mittelwert gebildet. Die Auszählung erfolgte verblindet, d.h. die Art des konsumierten Getränkes war bei der Auszählung nicht bekannt.

2.8 In vitro Stimulation von Monozyten mit Ethanol

Das für die Isolation der Monozyten notwendige Blut wurde bestellt und am Tag der Isolation in Form von buffy coats abgeholt. Die buffy coats entstehen nach dem Abzentrifugieren von Vollblut und enthalten hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten, wobei sich im Überstand Serum befindet und sich die Erythrozyten unterhalb der dünnen buffy coat Schicht ansammeln.

Die Monozyten wurden aus buffy coats nach der oben ausführlich beschriebenen Methode isoliert und für die Migration eingesetzt. Davor wurde ein Teil der Monozyten zusätzlich 1 Stunde mit jeweils 0,1% Ethanol und 1nM MCP1; 0,3% Ethanol und 1nM MCP1; 0,5% Ethanol und 1nM MCP1 vorstimuliert. Dann erfolgte die Stimulation der restlichen Zellen mit 0,1mM FMLP oder 1nM MCP1. Als Negativkontrolle wurde RPMI ohne Zusatz verwendet. Alle Monozyten wurden 3 Stunden in der Chemotaxiskammer inkubiert.

2.9 Lösliches ICAM-1

Der Parameter ICAM-1 wurde mittels eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) von Fa. R&D Systems, Germany aus den tiefgefrorenen Plasmaproben bestimmt. Dieser Immunoassay quantifiziert rekombinantes und natürliches humanes sICAM-1. Der Inter-assay-Variationskoeffizient war <10%.

2.10 Lösliches E-Selektin

E-Selektin wurde mittels eines ELISA (Fa. R&D Systems, Germany) aus tiefgefrorenen Plasmaproben bestimmt. Dieser Assay enthält rekombinantes humanes lösliches E-Selektin und Antikörper gegen den rekombinanten Faktor. Der Inter-assay-Variationskoeffizient betrug <10%.

2.11 Statistische Methoden

Die gewonnenen Laborproben wurden ausschließlich mit Identifikationsnummern gekennzeichnet, ebenso enthalten die Fragebögen von Beginn an nur Daten in anonymisierter Form.

Für die statistischen Auswertungen wurde Statistical Analysis System (SAS) Institute Inc., Version 8.2 für Windows NT der Firma SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, verwendet.

Strukturgleichheit und Beobachtungsgleichheit sollte durch geschichtete Randomisierung der Vergleichsgruppen sichergestellt werden. Es erfolgte eine deskriptive Zusammenfassung der Daten mit tabellarischer Auflistung und graphischer Darstellung. Die Lageparameter (zentrale Tendenz der Häufigkeitsverteilung, Mittelwert, Median) sowie die Streuungsparameter (Varianz, Standardabweichung) wurden bestimmt.

Die Monozytenmigration, stimuliert mit MCP-1 oder FLMP, wurde vor und nach der Intervention gemessen und verglichen. Dies erfolgte zweiseitig mit der Hilfe von Student`s paired t-test und Wilcoxon sign rank test.

Das Signifikanzniveau $p< 0,05$ wurde für alle durchgeführten statistischen Tests festgelegt.

3 Ergebnisse

Die Studienpopulation setzte sich aus insgesamt 42 Männer und Frauen im Alter von 23 bis 56 Jahren zusammen. Die Compliance der Studienteilnehmer wurde anhand der Einhaltungsbestätigung der Probanden überprüft. Außerdem wurden nach jeder Interventionsphase die leeren Flaschen zurück genommen und kontrolliert. Es ergaben sich keine Hinweise auf unzureichende Compliance.

Die klinischen und biochemischen Parameter, die das Studienkollektiv kennzeichnen, wurden in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Altersmittelwert, Body Mass Index (BMI) und die Leberenzymkonzentrationen wiesen keine signifikante Differenzen zwischen den unterschiedlichen Studiengruppen auf.

Tab. 3: Klinische und biochemische Parameter der Studienteilnehmer. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)
Bier/Wein (-) - entalkoholisiert Bier/Wein, BMI - body mass index, AST - aspartate aminotransferase, ALT - alanine aminotranferase, GGT - gamma-glutamyl transferase, n.s. - nicht signifikant
Alle Parameter wurden als arithmetrischer Mittelwert dargestellt (Standardabweichung)

	Bier	Bier (-)	Wein	Wein (-)	Ethanol	Wasser	p
Alter [Jahre]	40,5 (8,7)	35,3 (8,1)	39,7 (6,1)	40,3 (9,4)	38,0 (4,5)	34,8 (7,4)	n.s.
BMI [kg/m²]	23,3 (3,9)	23,3 (5,0)	22,9 (2,0)	22,9 (2,4)	23,4 (2,3)	22,8 (3,5)	n.s.
GGT [U/l]	28 (15)	21 (12)	13 (4)	26 (13)	30 (19)	22 (11)	n.s.
AST [U/l]	26 (10)	22 (10)	18 (5)	21 (5)	23 (6)	27 (11)	n.s.
ALT [U/l]	30 (11)	25 (15)	19 (7)	31 (15)	35 (21)	32 (19)	n.s.

3.1 Ex Vivo Versuche

Bei der ex vivo durchgeführten Monozytenmigration verwendeten wir zwei etablierte Zellstimulantien, Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) und Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) mit den Endkonzentrationen 1nM MCP1 und 0,1 mM FMLP. Bei den Proben jedes Probanden erfolgte nach der Auswaschphase, vor Intervention sowie nach Intervention eine Untersuchung des Monozytenmigrationsverhaltens.

3.1.1 Zellstimulation mit MCP-1

Nach Monozytenstimulation mit MCP-1 erhöhte sich die Anzahl migrierter Zellen auf das 1,82-fache verglichen mit nicht stimulierten Zellen. Dabei waren zwischen den verschiedenen Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Nach einer dreiwöchigen Intervention mit Ethanol konnten wir eine Hemmung der Monozytenmigration nachweisen. Vor dem Ethanolkonsum zeigte sich eine um das 1,78-fache induzierte Migration, nach Ethanolkonsum wurde lediglich eine Stimulierung von 0,75-fach dokumentiert. Daraus ergab sich eine signifikante Hemmung der Monozytenmigration um 58%.

Bei den Probanden, die entalkoholisierten Rotwein konsumierten, wurde eine ähnliche Wirkung beobachtet. Nach Stimulation mit MCP-1 nahm die Monozytenmigration im Vergleich vor und nach Intervention vom 1,96-fachen auf den 1,25- fachen Wert ab. Damit zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Monozytenwanderung um 36% ($p<0.05$).

Eine Tendenz zur Abnahme der Monozytenmigration lies sich auch in allen anderen Interventionsgruppen erkennen. Der beobachtete Effekt erreichte jedoch in keiner der Gruppen statistische Signifikanz (Abb.9).

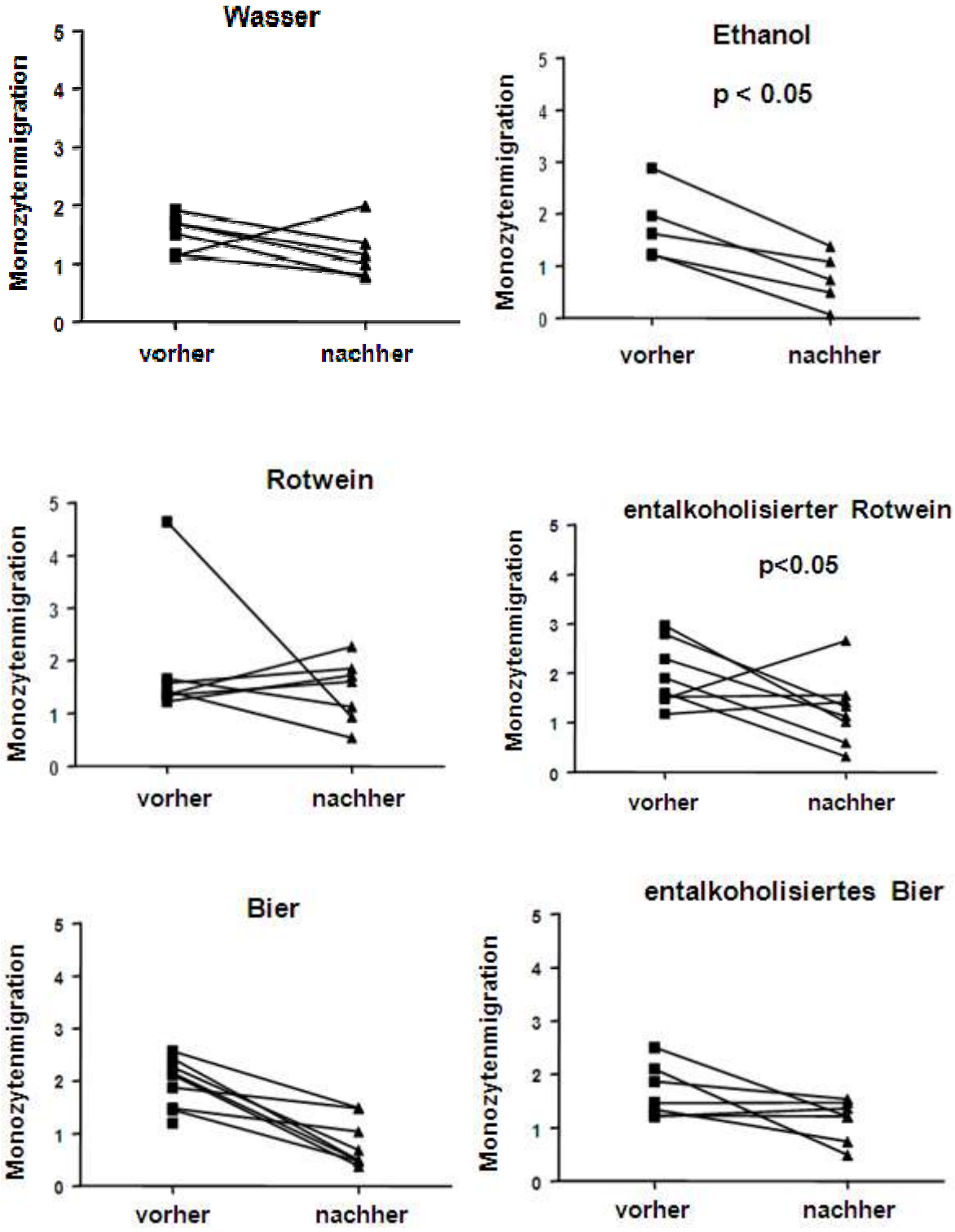


Abb. 9: Der Einfluss von moderatem Alkoholkonsum und den korrespondierenden alkoholfreien Getränke (auf der X-Achse) auf die Monozytenmigration (auf der Y-Achse) ex vivo. Die Daten zeigen den Mittelwert der Induktion vor und nach der Intervention pro Proband. Als Zellstimulans wurde MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) verwendet. Statistisch signifikante Hemmung der Monozytenwanderung $p<0.05$, bei der Interventionsgruppen mit Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)

3.1.2 Zellstimulation mit FMLP

Der inhibitorische Effekt von Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein auf die Monozytenmigration unter der Einwirkung des Zellstimulans FMLP wurde ebenfalls untersucht. Statistisch signifikante Werte zeigten sich bei der Intervention mit Ethanol: vor der Intervention lag die Induktion beim 2,37-fachen des Basalwertes, danach wurde sie auf das 1,4-fache reduziert (Abnahme der Monozytenmigration um 41 %, $p<0.05$). Bei den Probanden, die entalkoholisierten Rotwein konsumierten, nahm die Monozytenmigration vom 2,17-fachen auf das 1,39-fache ab ($p<0.05$) (Abb. 10). Somit ergab sich eine Herabsetzung der Monozytenmigration um 36 %.

In den Gruppen mit den Interventionssubstanzen Wasser (n=6) und Wein (n=7) beobachteten wir nur einen geringen Interventionseinfluss auf der Migrationssrate der Monozyten. Bei den Interventionen mit Bier (n=9) und entalkoholisiertem Bier (n=7) fanden wir eine deutliche Wirkung auf die Monozytenmigration. Somit wurde nach der Intervention mit alkoholhaltigem Bier und alkoholfreiem Bier eine Verringerung der Monozytenmigrationsrate beobachtet, jedoch erwiesen sich die Ergebnisse als nicht statistisch signifikant.

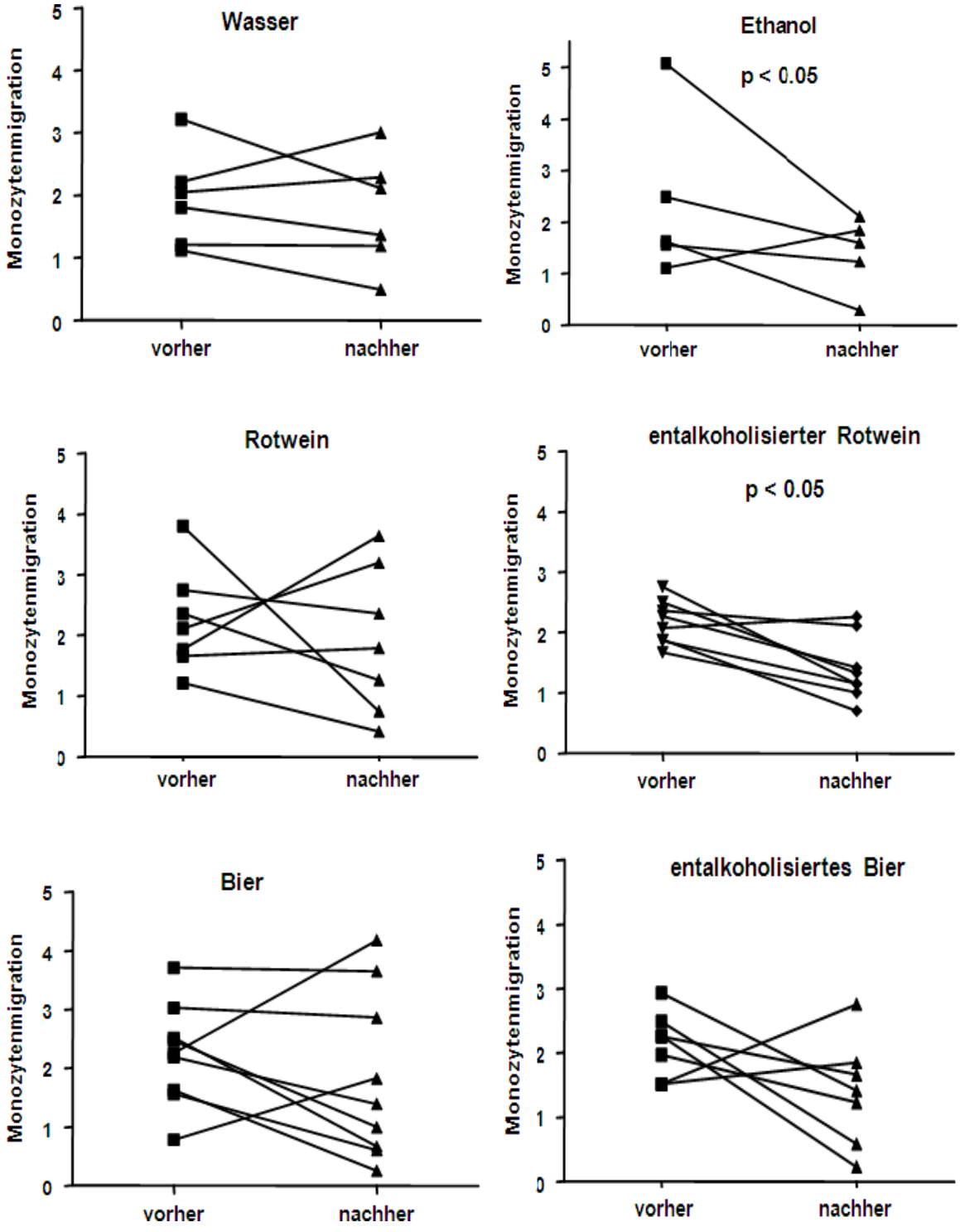


Abb. 10: Der Einfluss von moderatem Alkoholkonsum und den korrespondierenden alkoholfreien Getränken (auf der X-Achse) auf die Monozytenmigration (auf der Y-Achse) ex vivo. Die Daten zeigen den Mittelwert der Induktion vor und nach der Intervention pro Proband. Statistisch signifikante Hemmung der Monozytenwanderung, $p<0.05$, bei der Interventionsgruppen mit Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein. Als Zellstimulans wurde FMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) verwendet. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)

Bei der ex vivo untersuchten Monozytenmigration beobachteten wir einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Monozytenwanderung nach der Intervention mit Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein, unabhängig vom verwendeten Zellstimulans. In allen anderen Interventionsgruppen zeigte sich eine Reduktion der Migrationsrate ohne statistische Signifikanz der Ergebnisse.

3.2. In Vitro Versuche

Um die unmittelbare Auswirkung von Alkohol auf die Monozytenwanderung zu überprüfen, führten wir eine Stimulation in vitro durch. In vitro Experimente mit Monozyten aus zehn gesunden Blutspendern zeigten einen direkten dosisabhängigen inhibitorischen Effekt von Ethanol auf die Monozytenmigration. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Migration der mit MCP-1 stimulierten Monozyten bei einer Ethanolkonzentration von 0,5%. Es ist ein dosisabhängiger Effekt festzustellen, der bei 0.5% Ethanol Lösung den statistisch signifikanten Bereich erreicht (Abb.11).

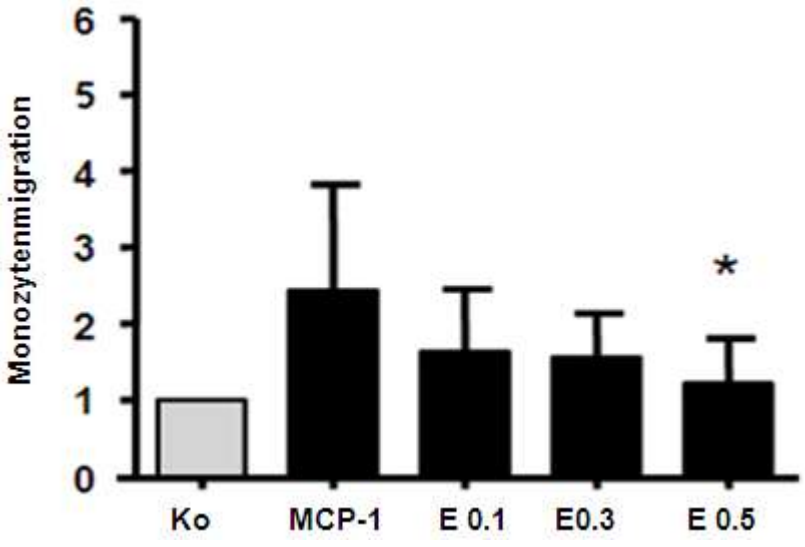


Abb. 11: Ethanol inhibierte in vitro konzentrationsabhängig die MCP-1 induzierte Monozytenmigration. Eine statistische Signifikanz (*p<0.05) zeigte sich bei der Ethanolkonzentration von 0.5%. Abkürzungen: Ko - Kontrolle, E - Ethanolkonzentration in %, MCP-1 - Monocyte chemotactic protein-1. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)

3.3 Biomarker

Die Hypothese, dass Adhäsionsmoleküle einen Einfluss auf die inflammatorische Zellaktivierung haben, wird diskutiert.

Die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 standen im Mittelpunkt unserer Untersuchung. Insgesamt zeigte sich ein uneinheitliches Bild, das den Schluss zulässt, dass die gemessenen zirkulierenden Biomarker wahrscheinlich keine Rolle spielen. Ein potentieller Einfluß der unterschiedlichen Getränke auf die Eigenschaften der Adhäsionsmoleküle an der Gefäßwand ist dennoch möglich.

3.3.1 E- Selektin

Weder der Konsum von alkoholischen noch von entalkoholisierten Getränken hat eine Senkung der E-Selektin-konzentrationen bewirkt. Wir beobachteten stattdessen einen statistisch signifikanten Anstieg der E-Selektin-Plasmakonzentrationen nach der Intervention mit Rotwein (Abb. 12).

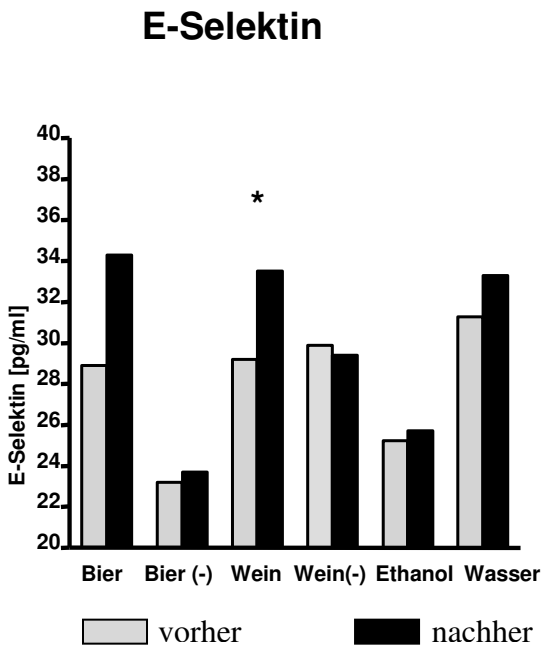


Abb. 12: Der Einfluss von moderatem Alkoholkonsum und den korrespondierenden alkoholfreien Getränken auf die Plasmakonzentration von E-Selektin. Die Daten zeigen den Mittelwert der Induktion vor und nach der Intervention pro Proband. Statistisch signifikante Ergebnisse ber der Intervention mit Wein wurden beobachtet. Mit dem Symbol * ist der statistisch signifikante Anstieg ($p < 0.05$) vermerkt. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)

3.3.2 ICAM-1

Die ICAM-1-Konzentrationen nahmen nach dem Konsum von Rotwein, entalkoholisiertem Rotwein und Ethanol deutlich ab. Bei den Bierkonsumenten konnte man keinen reduzierenden Effekt beobachten. Die beobachteten Abnahmen der ICAM-1 Konzentrationen waren allerdings weder in der Kontrollgruppe, noch nach Intervention statistisch signifikant (Abb.13).

Insgesamt ergab sich bei den Effekten auf die gemessenen Adhäsionsmolekül-konzentrationen kein einheitliches Bild. Bei höheren Ethanolkonzentrationen zeigten sich zwar niedrigere ICAM-1 Werte, die sich allerdings auch nach Wasserkonsum fanden.

Insgesamt waren die Effekte auf die sytemischen Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle nicht konsistent. Mögliche lokale Effekte auf die Gefäßwand konnten allerdings nicht untersucht werden.

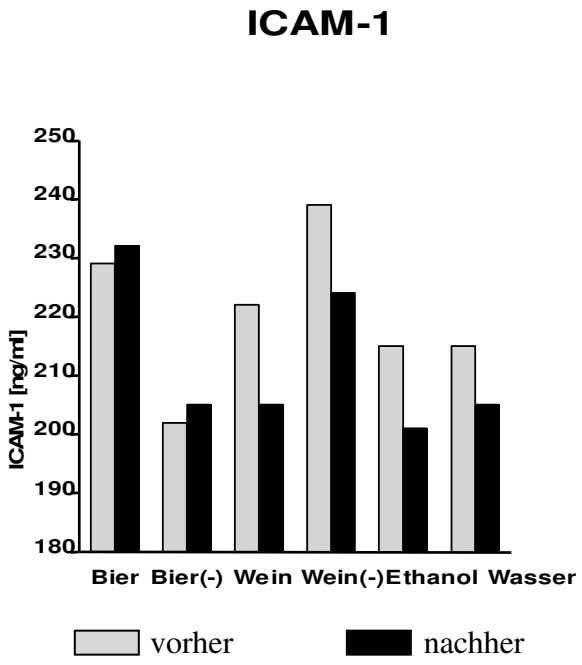


Abb. 13: Der Einfluss von moderatem Alkoholkonsum und den korrespondierenden alkoholfreien Getränken auf die Plasmakonzentration von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). Die Daten zeigen den Mittelwert der Induktion vor und nach der Intervention pro Proband. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden nicht dokumentiert. Modifiziert nach Imhof et al. (2003)

4 Diskussion

In mehreren epidemiologischen Studien wurden antiinflammatorische Effekte von moderatem Alkoholkonsum beobachtet. Es wird diskutiert, dass sie einen Teil des protektiven Effekts moderaten Alkoholkonsums auf kardiovaskuläre Erkrankungen erklären könnten.

Moderater Alkoholkonsum wird als kardioprotektiver Faktor postuliert [12], [25], [43], [53]. Ethanol selbst, sowie den im Wein enthaltenden Polyphenolen, werden antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben [17]. Bislang wurde die Wirkung von Alkohol auf die Konzentration von Adhäsionsmolekülen und auf die Wanderung der Monozyten nicht systematisch untersucht. Ebenfalls unklar ist der Einfluss des Getränketyps in Bezug auf sein kardioprotektives Potential [59].
Ein entscheidender Schritt in der pathophysiologischen Entstehung der Atherosklerose besteht in der Adhäsion der Monozyten aus der Blutbahn und ihrer Migration durch das Endothel in den subendothelialen Raum [22], [34], [41]. Der Prozess des Anhaftens und des Wanderns der Monozyten durch die Gefäßintima wird durch das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) vermittelt. MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) reguliert die transendotheliale Diapedese von Monozyten. Anschließend finden die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die unregulierte Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen statt.

Die eingenommenen alkoholhaltigen Getränke üben einen vielseitigen Einfluss auf die spezifische und unspezifische Immunabwehr aus [15], [46], [62]. Unter anderem durch den Ethanoleinfluss wird die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen supprimiert. Beispiele dafür sind die verminderte Bildung von TNF-α (Tumor necrosis factor α), Interleukin (IL)-1β, IL-6, IL-8, und MCP-1 (monocyte-chemoattractant protein-1) in den Alveolarmakrophagen und in den menschlichen Blutmonozyten. Dieser Effekt wird in vivo und in vitro beobachtet [23], [31], [47], [63], [66].

Ziel unserer Studie war es, den Einfluss verschiedener alkoholischer Getränke auf die Monozytenmigration experimentell zu prüfen.

Experimentelle Studien und Untersuchungen, basierend auf Forschungsarbeiten mit Zellkulturen und Mausmodellen, zeigen ein charakteristisches Muster nach Alkoholkonsum. Es findet sich ein Zusammenhang zwischen der eingenommenen Alkoholmenge und der Reduktion der Leukozytenadhäsion sowie der entzündungs- und infektionsbedingten Endothelzellaktivierung. Eine signifikante Herabsetzung der Monozytenadhäsion in Richtung des Entzündungsherdes wird nach einer Alkoholgabe, die äquivalent zu einem oder zwei alkoholischen Getränke ist, beobachtet [59].

Badia et al. führten eine Cross-over Interventionsstudie mit einer 4 wöchigen Interventionsphase und der Einnahme von Rotwein oder Gin durch [5]. An dem Versuch nahmen 8 Probanden teil und es wurde die Wirkung von 30 g Alkohol untersucht. Dabei wurde ex vivo eine Reduktion der durch TNF-α induzierten Monozytenadhäsion an der Endothelschicht nachgewiesen. Ferner wurde ein Nachlassen der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen bei Konsum beider Getränke dokumentiert. Dennoch hat sich der, nach der Intervention mit Rotwein, beobachtete Effekt als wesentlich stärker erwiesen. Das Autorenkollektiv vermutet einen Synergismus zwischen der experimentell beobachteten Ethanolwirkung und den im Rotwein enthaltenen hohen Konzentrationen von Polyphenolen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise auch die Monozytenmigration durch alkoholhaltige Getränke beeinflusst wird. In den Gruppen mit alkoholhaltigen Getränken kann tendenziell eine abnehmende Monozytenwanderung beobachtet werden. Dieser Trend unterstützt unsere Hypothese einer Abnahme der Monozytenmigration durch Alkohol.

Andere Autoren vertreten die Meinung, dass ausschließlich andere Inhaltstoffe alkoholhaltiger Getränke für die kardioprotektiven Effekte verantwortlich sind. Sie verfechten den Standpunkt, dass nicht der Alkohol selbst, sondern Bestandteile wie zum Beispiel Flavonoide und Polyphenole für die beobachtete Wirkung verantwortlich sind. Dies wurde hauptsächlich bei Konsum von Rotwein berichtet [54].

Unsere Daten unterstützen diese These nicht. Wir konnten einen am stärksten ausgeprägten Effekt auf die Monozytenmigration nach Intervention mit Ethanol aber auch nach entalkoholisiertem Rotwein zeigen. Somit lässt sich eine Änderung des Migrationsverhaltens in Abhängigkeit von der Art des Getränkes erkennen, jedoch keine systematische Zuordnung des Effektes zu entweder Ethanol oder Antioxidantien. Generell

wurde in allen Interventionsgruppen tendenziell eine inhibitorische Wirkung beobachtet. Dieser Effekt erreichte allerdings nicht in allen Gruppen statistische Signifikanz. Dies impliziert, dass unsere Daten keine schlüssige Beantwortung der eingangs gestellten Fragestellung zulassen.

Die schwächste Auswirkung auf die Monozytenwanderung wurde in den Bier konsumierenden Gruppen registriert. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die niedrigere Konzentration von Polyphenolen und Ethanol im Bier sein. In der Gruppe mit entalkoholisiertem Rotwein zeigte sich beim Anwenden beider Zellstimulantien eine signifikante inhibitorische Wirkung. Dieser starke Effekt lässt vermuten, dass den Polyphenolen eine beachtliche Rolle im Migrationsverhaltensmuster der Monozyten zuzuschreiben wäre.

Diese Erkenntnis suggeriert, dass die vermutete kardioprotektive Wirkung möglicherweise auf einen synergistischen Effekt des Ethanols mit anderen Inhaltstoffen zurückzuführen sein könnte. Unsere Auswertungen können nicht sicher unterscheiden ob nur Ethanol oder ausschließlich Polyphenole ein inhibitorisches Potential auf die Monozytenmigration haben.

Im Rahmen der Studie untersuchten wir ergänzend die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 um ihren Einfluss auf die inflammatorischen Zellaktivierung zu überprüfen. Unsere Daten ergaben kein einheitliches Bild der Effekte auf die gemessenen Adhäsionsmolekülkonzentrationen.

Unsere Studie basiert hauptsächlich auf der Beurteilung der mittelfristigen Effekte von alkoholhaltigen und alkoholfreien Getränken auf die Monozytenmigration. Eine akute, unmittelbare Bewertung der Wirkung war aus praktischen Gründen nicht möglich. Möglicherweise wirken sich die Interventionssubstanzen zeitabhängig auf die Monozytenmigration aus. Der Wirkungszeitraum würde dabei durch die Eliminationsgeschwindigkeit von Alkohol und Phenolen aus dem Blut bestimmt. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass „Binge Drinking“ – Exzesse nicht nur keine kardioprotektive Wirkung aufweisen, sondern mit einer schwerwiegenden Immunsuppression, anschließenden Infektionen und einer höheren Gesamtmortalitätsrate assoziiert sind [43].

Ein Forschungsziel von zukünftigen Studien könnte die Unterscheidung der akuten und auch der chronischen Wirkung des moderaten Konsums alkoholischer und entalkoholisierter Getränke auf die Monozytenmigration darstellen.

Folgende Limitationen der Studie sind bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen:

Erstens wurden die Auswirkung diätetischer Effekte und der körperlichen Aktivität auf die Monozytenmigration nicht überprüft. Allerdings wurden alle Teilnehmer vor dem Einschluss in die Studie ausdrücklich darauf hingewiesen wurden, ihre Ess- und Sportgewohnheiten während der Teilnahme an der Studie nicht zu ändern. Eine Änderung diätetischer Gewohnheiten und der gewöhnlichen körperlichen Aktivität kann potentiell die Effekte der Intervention maskieren.

Zweitens haben wir in unserer Studie den mittelfristigen Effekt von alkoholischen und alkoholfreien Getränken auf die Monozytenwanderung geprüft. Die Alkoholkonzentration im Blut nach der Intervention wurde nicht bestimmt.

Drittens wurden alle Studienteilnehmer sorgfältig nach interkurrenten Infektionen und nach Störungen des Allgemeinbefindens während der Studiendauer befragt. Dennoch können wir einen subklinischen inflammatorischen Prozess mit Auswirkung auf die von uns gemessenen Parameter nicht völlig ausschließen.

Viertens können wir trotz der beobachteten signifikanten Inhibition der Monozytenmigration nach Intervention, keine Aussage zu einem kausalen Zusammenhang im Sinne der Reduktion der Atherosklerose machen.

Fünftens stellt die geringe Anzahl der Studienteilnehmer eine weitere Einschränkung der Studie dar und erklärt zumindest teilweise die fehlende statistische Signifikanz der Ergebnisse.

Trotz aller Einschränkungen lassen unsere Resultate jedoch den Schluss zu, dass der moderate Konsum von Alkohol wie auch vergleichbarer entalkoholisierter Getränke die Monozytenmigration inhibiert. Die Hemmung dieses entscheidenden Schrittes der frühen Atherogenese kann einen Faktor darstellen, über dessen Modifikation moderater Alkoholkonsum zu einer Senkung des kardiovaskulären Risikos führt bzw. beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Moderater Alkoholkonsum ist in epidemiologischen Studien mit geringerer kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. Dieser Zusammenhang ergibt sich beim Vergleich moderaten Alkoholverbrauchs mit Alkoholabstinenz und starkem Alkoholkonsum. Experimentelle Untersuchungen deuten auf einen direkten Effekt von Alkohol bei der Formierung der arteriosklerotischen Läsionen hin.

Die Monozytenmigration durch das Endothel stellt einen entscheidenden Schritt in der Atherogenese dar. Wir untersuchten gezielt in vivo und in vitro den Einfluss moderater Mengen alkoholischer und nicht alkoholischer Getränke auf die Monozytenwanderung.

Die Studie wurde als kontrollierte, randomisierte und einfach verblindete Interventionsstudie durchgeführt. Die Studienpopulation setzte sich aus insgesamt 42 Männern und Frauen im Alter zwischen 23 und 56 Jahren zusammen. Nach einer Auswaschphase mit Alkoholkarenz erfolgte eine Gruppenaufteilung je nach Studiengetränk- jeweils eine Gruppe mit Rotwein (Alkoholgehalt 12,5%), mit Bier (Alkoholgehalt 5,6%) und mit niedrigprozentiger Ethanollösung (Alkoholgehalt 12,5%) sowie Vergleichsgruppen mit denselben Getränken ohne Alkohol. Die Monozytenmigration wurde ex vivo mittels Chemotaxiskammer (Boyden Kammer) evaluiert.

Der Konsum von Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein reduzierte statistisch signifikant die Monozytenmigration ex vivo. In der Ethanolgruppe zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Monozytenmigration um 58% nach Stimulation mit MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) und um 41% nach Stimulation mit FMLP (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). In der Gruppe mit entalkoholisiertem Rotwein beobachteten wir eine statistisch signifikante Inhibition der Monozytenmigration um 36% nach Stimulation mit MCP-1 und entsprechend um 36% nach Stimulation mit FMLP.

Die unmittelbare Auswirkung von Alkohol auf die Monozytenwanderung wurde mittels in vitro Stimulation untersucht. Einen direkten dosisabhängigen inhibitorischen Effekt von Ethanol auf die Monozytenmigration konnte mit MCP-1 bei einer Ethanolkonzentration von 0,5% gezeigt werden.

Eine statistisch signifikante Hemmung der Monozytenmigration wurde nach 3-wöchiger Intervention mit moderaten Mengen von Ethanol und entalkoholisiertem Rotwein beobachtet. Unsere Daten legen die mögliche Bedeutung der Inhibition der Monozytenmigration als einen Mechanismus für den kardioprotektiven Effekt alkoholischer Getränken nahe. Umfangreichere Studien sind allerdings notwendig um unsere Ergebnisse zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

[1] Adams DH, Shaw S: Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. Lancet 343:831-836 (1994)

[2] Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS: Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes, Part II: Acute-Phase Reactants and Biomarkers of Endothelial Cell Activation. Circulation 113:e152-e155 (2006)

[3] Aviram M, Fuhrman B: Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci 957:146-161(2002)

[4] Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B: Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. Handb Exp Pharmacol 170:263-300 (2005)

[5] Badia E, Sacanella E, Fernandez-Sola J, et al: Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. Am J Clin Nutr 80:225-230 (2004)

[6] Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W: Histologie mit Schemazeichnungen. Urban & Fischer, München Jena, S. 91- 92 (2000)

[7] Beckman JA, Creager MA, Libby P: Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA 287:2570-2581 (2002)

[8] Bell JR, Donovan JL, Wong R, et al : (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. Am J Clin Nutr 71:103-108 (2000)

[9] Bhatia VK, Haskard DO: Markers of inflammation in unstable angina. Heart 85:603-604 (2001)

[10] Blake GJ, Ridker PM (Harvard Medical School Boston, MA, USA): Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk prediction (Review). J Intern Med 252:283-294 (2002)

[11] Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L: Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis 170:191-203 (2003)

[12] Böhm M, Rosenkranz S, Laufs U: Alcohol and red wine: impact on cardiovascular risk. Nephrol Dial Transplant 19:11-16 (2004)

[13] http://www.dhs.de/fileadmin/user_upload/pdf/dhs_stellungnahmen/Grenzwerte_Alkoholkonsum_Jul10.pdf (11.04.2013)

[14] Cherubini A, Vigna GB, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R, Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. Curr Pharm 11:2017-2032 (2005)

[15] Crews FT, Bechara R, Brown LA, et al: Cytokines and alcohol. Alcohol Clin Exp Res 30:720-730 (2006)

[16] Das DK, Maulik N: Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. Mol Interv 6:36-47 (2006)

[17] Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A: Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. Drugs Exp Clin Res 25:115-120 (1999)

[18] De Curtis A, Murzilli S, Di Castelnuovo A, Rotilio D, Donati MB, De Gaetano G, Iacoviello L: Alcohol-free red wine prevents arterial thrombosis in dietary-induced hypercholesterolemic rats: experimental support for the 'French paradox'. J Thromb Haemost 3:346-350 (2005)

[19] Delmas D, Jannin B, Latruffe N: Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. Mol Nutr Food Res 49:377-395 (2005)

[20] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage, 4., korrigierter Nachdruck. Umschau/Braus, Frankfurt am Main (2012)

[21] Gearing AJ, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. Immunol Today 14:506-512 (1993)

[22] Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352:1685-1695 (2005)

[23] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res 91:281-291 (2002)

[24] Ignatowicz E, Baer-Dubowska W: Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. Pol J Pharmacol 53:557-569 (2001)

[25] Imhof A, Koenig W, Alcohol inflammation and coronary heart disease. Addict Biol 8:271-277 (2003)

[26] Imhof A, Blagieva R, Marx N, Koenig W: Drinking modulates monocyte migration in healthy subjects: a randomised intervention study of water, ethanol, red wine and beer with or without alcohol. Diab Vasc Dis Res 5:48-53 (2008)

[27] Johansen D, Friis K, Skovenborg E, Grønbaek M: Food buying habits of people who buy wine or beer: cross sectional study. BMJ 332:519-522 (2006)

[28] Kaski JC: Rapid coronary artery disease progression and angiographic stenosis morphology. Ital Heart J 1:21-25 (2000)

[29] Kasper H: Ernährungsmedizin und Diätetik. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S 64 (1996)

[30] Koenig W: Update on C-reactive protein as a risk marker in cardiovascular disease. Kidney Int Suppl 84:S58-61 (2003)

[31] Kolls JK, Xie J, Lei D, Greenberg S, Summer WR, Nelson S: Differential effects of in vivo ethanol on LPS-induced TNF and nitric oxide production in the lung. Am J Physiol 268:L991-998 (1995)

[32] Laraqui A, Bennouar N, Meggouh F, Allami A, El Kadiri N, Benkouka F, Azeddoug H, El Haitem N, Benomar A, Fellat S, Benomar M: Homocysteine, lipoprotein (a): risk factors for coronary heart disease. Ann Biol Clin 60:549-557 (2002)

[33] Libby P: Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. Am J Clin Nutr 83:456S-460S (2006)

[34] Libby P: Inflammation in atherosclerosis. Nature 420:868-74 (2002)

[35] Libby P: Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. Nutr Rev 65:S140-146 (2007)

[36] Libby P: Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. Am J Cardiol 88:3N-8N (2001)

[37] Libby P, Aikawa M, Schönbeck U: Cholesterol and atherosclerosis. Biochim Biophys Acta 1529:299-309 (2000)

[38] Libby P, Plutzky J: Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. Am J Cardiol 99:27B-40B (2007)

[39] Libby P, Ridker PM: Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. Am J Med 6A:9S-16S (2004)

[40] Lind L: Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. Atherosclerosis 169:203-214 (2003)

[41] Linton MF, Fazio S: Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. Int J Obes Relat Metab Disord 3:S35-40 (2003)

[42] Löffler G, Petrides P:Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S.723-725, S.1036 (1998)

[43] Makela P, Paljarvi T, Poikolainen K: Heavy and nonheavy drinking occasions, all-cause and cardiovascular mortality and hospitalizations: a follow-up study in a population with a low consumption level. J Stud Alcohol 66:722-728 (2005)

[44] Meyer CJ, John U: Alkohol - Zahlen und Fakten zum Konsum. In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen, Jahrbuch Sucht 2007, Neuland Geesthacht, S. 23-50 (2007)

[45] Miller DT, Ridker PM, Libby P, Kwiatkowski DJ: Atherosclerosis: the path from genomics to therapeutics. J Am Coll Cardiol 49:1589-1599 (2007)

[46] Nelson S, Kolls JK: Alcohol, host defence and society. Nat Rev Immunol 2:205-209 (2002)

[47] Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Summer WR: The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. J Infect Dis 160:422-429 (1989)

[48] Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, Gopal TV, Wiener-Kronish J, Matthay MA: Soluble E-Selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. J Immunol 150:644-654 (1993)

[49] Niessen H, Krijnen P, Visser C, Meijer C, Hack C: Intercellular adhesion molecule-1 in the heart. Ann NY Acad Sci 973:573-585 (2002)

[50] Opie LH, Lecour S: The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. Eur Heart J 28:1683-1693 (2007)

[51] Packard RR, Libby P: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem 54:24-38 (2008)

[52] Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS: Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthones and flavonoids isolated from Cudrania tricuspidata. Bioorg Med Chem Lett 16:5580-5583 (2006)

[53] Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ: Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. BMJ 319:1523-1528 (1999)

[54] Rimm EB, Stampfer MJ: Wine, beer, and spirits: are they really horses of a different color?. Circulation 105:2806-2807 (2002)

[55] Roitt I. M, Brostoff J, Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 22- 24 (1991)

[56] Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. Am Heart J 138:S419-20 (1999)

[57] Ross R, Agius L: The process of atherogenesis-cellular and molecular interaction: from experimental animal models to humans. Diabetologia 352: S34-40 (1992)

[58] Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol 86:675-684 (1977)

[59] Saeed RW, Varma S, Peng T, Tracey KJ, Sherry B, Metz CN: Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. J Immunol 173:6376-6383 (2004)

[60] Saladino R, Gualandi G, Farina A, Crestini C, Nencioni L, Palamara AT: Advances and challenges in the synthesis of highly oxidised natural phenols with antiviral, antioxidant and cytotoxic activities. Curr Med Chem 15:1500-1519 (2008)

[61] Stary HC: The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression. Am J Cardiol 88:16E-19E (2001)

[62] Szabo G: Consequences of alcohol consumption on host defence. Alcohol Alcohol 34:830-841(1999)

[63] Szabo G, Mandrekar P, Catalano D: Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. J Leukoc Biol 58:342-350 (1995)

[64] Tu YC, Lian TW, Yen JH, Chen ZT, Wu MJ: Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. J Agric Food Chem 55:9969-9976 (2007)

[65] Tzoulaki I, Gordon DM, Lee AJ, Rumley A, Lowe G, Fowkes G: C-reactive Protein, Interleukin-6, and Soluble Adhesion Molecules as Predictors of Progressive Peripheral Atherosclerosis in the General Population (Edinburgh Artery Study). Circulation 112:976-983 (2005)

[66] Verma BK, Fogarasi M, Szabo G: Down-regulation of tumor necrosis factor alpha activity by acute ethanol treatment in human peripheral blood monocytes. J Clin Immunol 13:8-22 (1993)

[67] Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD: Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol 47:C13-18 (2006)

[68] Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ: Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). Int J Mol Med 8:3-17 (2001)

[69] Ziegler-Heitbrock HW: Definition of human blood monocytes. J Leukoc Biol 67:603-606 (2000)

Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Koenig für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe „Präventive Kardiologie“ anfertigen zu können.

Herrn PD Dr. Armin Imhof möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas, seine hilfreiche Unterstützung und engagierte Betreuung herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Labore von Prof. Dr. W. Koenig und Prof. Dr. N. Marx für ihre nette und freundliche Hilfe und Beistand.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meine Familie richten, deren grenzenlose Unterstützung mich immer begleitet hat.