

in: „Aktuelle Aspekte
der Lipoprotein-
und Atheros-
kleroseforschung“

von: V. Richter
W. Reiter
F. Rassoul

Verlag Wissenschaftl.
Scripten

© 2000

Zelladhäsionsmoleküle bei Patienten mit Hypercholesterolämie und anderen Atherosklerose-Risikofaktoren

Richter, V.¹; Reuter, W.²; Purcz, Th.²; Weisbrich, Ch.¹; Remke, H.;¹
Wagner, O.¹; Hentschel, B.³; Julius, U.⁴; Gläser, V.⁵; Verlohren, H.-J.⁶;
Rassoul, F.¹

¹ Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universität Leipzig
Arbeitsgemeinschaft für Gesundheitsförderung und Atherosklerose-
prävention (AGA) e.V., Leipzig

² Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Universität Leipzig

³ Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie,
Universität Leipzig

⁴ Institut und Poliklinik für Klinische Stoffwechselforschung,
Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden

⁵ Vogtland-Klinik Plauen GmbH

⁶ Diabetes-Ambulanz, Leipzig

Die Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose. Eine verstärkte Monozyten-Adhäsion an das Gefäßendothel, eine gesteigerte transendotheliale Wanderung von Monozyten und ihre Lipidbeladung im subendothelialen Raum stellen entscheidende Schritte bereits in der Herausbildung frühzeitiger atherosklerotischer Veränderungen dar. Auch in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose-Manifestation sind entsprechende Wechselwirkungen von Bedeutung. Gegenwärtig werden die Mechanismen der Monozyten-Endothelzell-Interaktionen intensiv untersucht und in diesem Zusammenhang ist die Regulation von endothelialen Leukozytenadhäsionsmolekülen wesentlich. Adhäsionsmoleküle stellen Membranproteine dar, die bei Entzündungsreaktionen und auch unter atherogenen Bedingungen verstärkt exprimiert werden (1, 2). E-Selektin (CD 62 E, Endotheliales Leukozytenadhäsionsmolekül-1) bewirkt das sogenannte Rolling von Leukozyten bzw. Monozyten entlang der Gefäßwand und deren Aktivierung. ICAM-1 (CD 54, Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) und VCAM-1 (CD 106, Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1) vermitteln Adhäsion und transendotheliale Wanderung von Monozyten. Adhäsionsmoleküle treten nach proteolytischer Abspaltung ihrer extrazellulären Domäne auch in löslicher Form im Blutplasma auf, insbesondere unter den Bedingungen ihrer verstärkten zellulären Expression (2, 3, 4, 5). Es sind Zusammenhänge zwischen erhöhten Konzentrationen der zirkulierenden Zel-

ladhäsionsmoleküle cICAM-1, cVCAM-1 und cE-Selektin, Atherosklerose-Risikofaktoren einschließlich Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen worden, und unter diesem Blickpunkt wird auch diskutiert, inwieweit zirkulierende Zelladhäsionsmoleküle als molekulare Marker der Atherosklerose zu betrachten sind (6, 7, 8).

Gegenwärtig stehen in diesem Zusammenhang Fragestellungen der Regulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen und des Spiegels der zirkulierenden Leukozyten-Adhäsionsmoleküle im Mittelpunkt des Interesses. In diesem Rahmen ist auch die Hypothese eines erhöhten kardiovaskulären Risikos für Träger mit einer Punktmutation im E-Selektin (Ser128Arg-Mutation) infolge erhöhter Affinität und veränderter Bindungsspezifität für Leukozyten von Bedeutung (9).

Fragestellungen der vorliegenden Untersuchungen beziehen sich auf die Beeinflussung des Spiegels von cE-Selektin, cICAM-1 und cVCAM-1 durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, vor allem unter dem Aspekt eines möglichen Effektes der Hypercholesterolämie, und auf das Vorliegen der E-Selektin-Ser128 Arg-Mutation bei Patienten mit Diabetes mellitus. Da unklar ist, inwieweit Hypercholesterolämien mit einer verstärkten Expression von Zelladhäsionsmolekülen und erhöhten Konzentrationen zirkulierender Formen dieser Moleküle verbunden sind, wurden Personen mit Hypercholesterolämie, jedoch ohne klinisch nachweisbare kardiovaskuläre Erkrankungen sowie ohne weitere Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose wie Hypertonie, Rauchen und Adipositas im Rahmen einer Studie in Untersuchungen zum Spiegel zirkulierender Zelladhäsionsmoleküle aufgenommen. Getrennt erfolgte die Betrachtung des Einflusses der genannten Atherosklerose-Risikofaktoren. Parallel hierzu wurde in einer multizentrischen Studie ermittelt, ob extrakorporale LDL-Elimination zu einer Verringerung der Konzentration der zirkulierenden Adhäsionsmoleküle cE-Selektin, cICAM-1 und cVCAM-1 führt.

1 Methodik

Folgende Patienten- bzw. Probandengruppen wurden in die Untersuchungen einbezogen:

- Probanden im Rahmen der ILSE-Studie (Interdisziplinäre Langzeitstudie des gesunden Erwachsenenalters) Leipzig und der Gesundheitsstudie Leipzig (Gesundheitsuntersuchung über den Dauereinfluss von Umwelt- und Lebensfaktoren auf Altern und Leistungsfähigkeit), insgesamt 156 Männer und Frauen im Alter von 45-75 Jahren mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren Hypercholesterolämie, Hypertonie, Rauchen, Adipositas und Diabetes mellitus.

- Patienten mit heterozygoter familiärer Hypercholesterolämie (8 Männer und Frauen im Alter von 37-67 Jahren in drei LDL-Apherese-Zentren (Universitätsklinikum Leipzig, Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden und Vogtland-Klinik Plauen), in welchen diese sich einer regelmäßigen extrakorporalen LDL-Elimination unterziehen, da die Kombination lipidsenkende Diät – Pharmakotherapie nicht hinreichend ist, um anzustrebende LDL-Cholesterol-Spiegel zu erreichen. Es wurde das DALI-Verfahren eingesetzt (Direkte Adsorption von Lipiden, Fresenius St. Wendel), innerhalb dessen die LDL- und LP_(a)-Elimination nicht aus dem Plasma, sondern aus Vollblut durch Adsorption an Polyacrylamid (10) erfolgt. Das Studiendesign sah die Messung der Konzentration zirkulierender Adhäsionsmoleküle unmittelbar vor dem erstmaligen Beginn der Apherese-Therapie sowie nach 1,2,3 und 6 Monaten kontinuierlicher LDL-Apherese-Behandlung vor, die in etwa einwöchigen Abständen durchgeführt wurde.
- Patienten mit Diabetes mellitus (36 Männer und Frauen aus der Diabetes-Ambulanz Leipzig, Lindenauer Markt).

Es erfolgten Blutentnahmen aus der Armvene, und die gewonnenen Serumproben wurden portioniert bei -80°C gelagert. Zur Konzentrationsbestimmung der zirkulierenden Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin wurden Enzymimmunoassays von R & D Systems, Europe Ltd, herangezogen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient der Messung der Zelladhäsionsmoleküle betrug $< 5\%$.

2 Ergebnisse

Probanden der ILSE- und Gesundheitsstudie Leipzig mit Hypercholesterolämie (Serumcholesterol $> 6,0\text{ mmol/l}$) ohne Vorliegen weiterer Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose und ohne klinisch manifeste kardiovaskuläre Erkrankungen weisen keine höheren mittleren Spiegel an cVCAM-1, cICAM-1 und cE-Selektin auf als Teilnehmer der entsprechenden Studien ohne Hypercholesterolämie (Abb. 1).

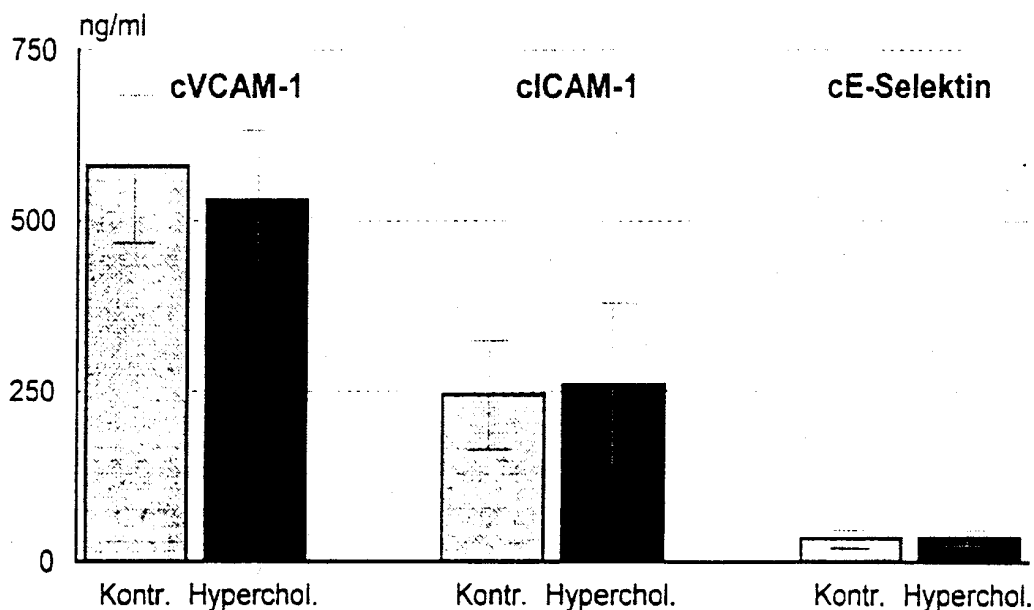


Abb. 1: Zirkulierende Zelladhäsionsmoleküle bei männlichen Kontrollpersonen (Kontr., $n = 17$) und Probanden mit Hypercholesterolämie, Cholesterol $> 6,0$ mmol/l, $n = 14$) bei Ausschluß von Diabetes mellitus, Hypertonie, Adipositas und Rauchen, Mittelwerte \pm Standardabweichungen

Es wird deutlich, dass Zigarettenraucher durch signifikant höhere cICAM-1-Spiegel gegenüber Nichtrauchern gekennzeichnet sind. Bezüglich cVCAM-1 und cE-Selektin wurde kein Unterschied ermittelt (Abb. 2).

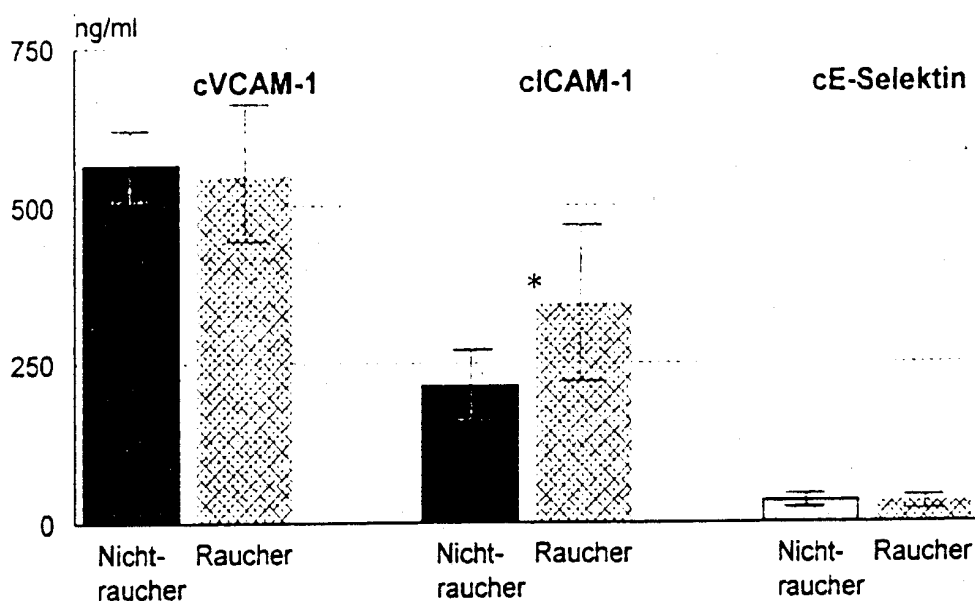


Abb. 2: Zirkulierende Zelladhäsionsmoleküle bei männlichen Nichtrauchern ($n = 16$) und Zigarettenrauchern ($n = 8$) bei Ausschluß weiterer Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose, Mittelwerte \pm Standardabweichungen, * $P < 0,05$

Für Patienten mit familiärer heterozygoter Hypercholesterolämie ist keine signifikante Veränderung des mittleren Serumspiegels der untersuchten Adhäsionsmoleküle im Zeitraum bis zu einem halben Jahr unter den Bedingungen regelmäßiger LDL-Apherese-Behandlungen zu beobachten ($P > 0,1$).

Die mittleren cVCAM-1-, cICAM-1 und cE-Selektin-Konzentrationen der Patienten unter LDL-Apherese (496 ng/ml, 253 ng/ml und 36 ng/ml) wiesen auch tendenziell keine Verminderung auf.

Gleichzeitig ist festzustellen, daß sich die Spiegel der zirkulierenden Zelladhäsionsmoleküle bei den in die Untersuchungen einbezogenen Hypercholesterolämie-Patienten im Referenzbereich befanden. Diese wurde aus den Daten der Teilnehmer der ILSE- und Gesundheitsstudie Leipzig ($n = 156$, $x \pm SD$) ermittelt und betrug für cVCAM-1 266 – 814 ng/ml, für cICAM-1 93 – 381 ng/ml und für cE-Selektin 7 – 75 ng/ml.

Für Patienten mit Diabetes mellitus konnte eine heterozygote E-Selektin-Mutation (Ser 128 Arg) lediglich mit einer Prävalenz von 5,6 % nachgewiesen werden. Die Häufigkeit ist damit nicht höher als in den anderen untersuchten Gruppen.

3 Diskussion

Leukozyten-Adhäsionsmoleküle treten auch im Blutplasma zirkulierend auf, und es wird ihr Stellenwert als Marker für Entzündungsaktivität und atherogenes Risiko diskutiert (7, 11). Unter dem Blickpunkt des Atheroskleroserisikos ist die Frage der diagnostischen Relevanz zirkulierender Zelladhäsionsmoleküle und ihre mögliche Beeinflussung durch verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren und antiatherogene Bedingungen von zentraler Bedeutung. Dabei ist gegenwärtig noch unklar, ob bei Hypercholesterolämie erhöhte Spiegel zirkulierender Adhäsionsmoleküle vorliegen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden einerseits Personen mit Hypercholesterolämie, jedoch ohne andere Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose in die Untersuchungen einbezogen, und andererseits erfolgte die Messung von Adhäsionsmolekülen im Serum von Patienten mit familiärer heterozygoter Hypercholesterolämie im Verlauf von LDL-Apherese Behandlungen.

Das Design der vorliegenden multizentrischen Untersuchung zum möglichen Einfluß der extrakorporalen LDL-Elimination war auf die Messung der Konzentration der zirkulierenden Zelladhäsionsmoleküle cICAM-1, cVCAM-1 und cE-Selektin im Verlauf von 6 Monaten nach Beginn der LDL-Apherese-Therapie ausgerichtet. Diese Therapiemaßnahme, die wöchentlich begleitend zu einer lipidregulierenden Pharmakotherapie und der Einhaltung einer entsprechenden Diät erfolgte, ermöglichte bei

den sich im Apherese-Programm befindlichen Hypercholesterolämie-Patienten eine zusätzliche drastische Senkung des LDL-Cholesterolspiegels. Im Verlauf einer LDL-Apherese-Behandlung wird eine Reduktion um fast 75 Prozent erreicht. Die Konzentration der untersuchten zirkulierenden Zelladhäsionsmoleküle blieb jedoch unverändert. Befunde von Sampietro und Mitarbeitern (12) bezüglich einer Regulation löslicher Zelladhäsionsmoleküle durch Plasmacholesterol lassen sich somit nicht bestätigen. Es ist zu schlußfolgern, dass kein direkter Zusammenhang zwischen Hypercholesterolämie an sich und dem Spiegel der gemessenen Adhäsionsmoleküle vorliegt. Auch Untersuchungen von Hackman und Mitarbeitern (13) ergaben, dass lipidsenkende Pharmakotherapie die Spiegel löslicher Zelladhäsionsmoleküle in Patienten mit Dyslipidämie kaum beeinflusst. Die Beobachtungen im Rahmen der durchgeführten Studie und andere Daten legen nahe, dass nicht die Hypercholesterolämie an sich, sondern andere Faktoren im Rahmen des metabolischen Syndroms, exogene Einflüsse und zugrundeliegende atherosklerotische Manifestationen mit erhöhten Spiegeln der gemessenen zirkulierenden Zelladhäsionsmoleküle verbunden sind (7, 11, 14, 15).

Dabei ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-kappa B und AP-1 mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Freisetzung in den Kreislauf korreliert (1). Ein erhöhter zellulärer oxidativer Stress, der zu einer NF-kappa B-Translokation führt, ist offensichtlich in die Mechanismen einer gesteigerten Expression der Zelladhäsionsmoleküle einbezogen. Es konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauchen mit einer verstärkten Monozyten-Endothelzell-Interaktion und mit einer erhöhten endothelialen ICAM-1-Expression verbunden ist (16). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde bei Rauchern als Teilnehmer der ILSE- und Gesundheitsstudie Leipzig ein erhöhter cICAM-1-Spiegel beobachtet. Dieser Befund ergänzt analoge Beobachtungen bezüglich der Konzentration des löslichen ICAM-1 unter dem Einfluß des Zigarettenrauchens bei Frauen im mittleren Lebensalter (17). Rauchen ist mit einem erheblichen oxidativen Stress verbunden, und eigene Untersuchungen weisen auf eine positive Korrelation zwischen der Konzentration konjugierter Diene und dem Serumspiegel zirkulierender Adhäsionsmoleküle hin (18).

Diabetes mellitus als wesentlicher Atherosklerose-Risikofaktor steht mit erhöhten Serumkonzentrationen von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen in Verbindung (2, 19). Einem gesteigerten oxidativen Stress im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellage könnte dabei eine besondere Rolle zukommen (20). Es wurde gezeigt, dass nicht Hyperinsulinämie per se bei Diabetes mellitus Typ II die Ursache erhöhter Spiegel zirkulierender Adhäsionsmoleküle, speziell von cVCAM-1, darstellt (21). Der Grad der Insulinresistenz scheint mit der Konzentration der Zelladhäsionsmoleküle cE-Selektin, cICAM-1 und cVCAM-1 zu korrelieren (15). Entsprechend den vorliegenden Untersuchungen liegt die Punktmutation im E-Selektin (Ser 128 Arg) bei Patienten mit Di-

abetes mellitus nicht in erhöhter Prävalenz vor. Es kann deshalb auch nicht postuliert werden, dass diese für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit Diabetes mellitus von Relevanz ist. Weitere Untersuchungen unter Einschluß von Patienten mit metabolischem Syndrom sollten hierüber Aufschluß geben.

Hypercholesterolämie allein bedingt offensichtlich keine Erhöhung des Spiegels zirkulierender endothelialer Adhäsionsmoleküle. Es ist davon auszugehen, dass erhöhte Spiegel von cICAM-1 und cE-Selektin Surrogatmarker der endothelialen Dysfunktion in Verbindung mit verschiedenen Faktoren des metabolischen Syndroms einschließlich erhöhtem oxidativen Stress und mit zugrundeliegender Atherosklerose darstellen, nicht jedoch mit Hypercholesterolämie per se. Diese Schlußfolgerung wird durch die vorliegenden Untersuchungen im Rahmen der ILSE-Studie und der Gesundheitsstudie Leipzig unterstützt, bei denen sich im Serum von Probanden mit Hypercholesterolämie ohne Vorliegen anderer Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose (Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus) keine erhöhten Konzentrationen der gemessenen Zelladhäsionsmoleküle nachweisen ließen (22).

Literatur

- /1/ Price DT, Loscalzo, J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am.J. Med.* 1999; 107: 85-97.
- /2/ Wagner OF, Jilma B. Putative role of adhesion molecules in metabolic disorders. *Hum. Metab. Res.* 1997; 29: 627-630
- /3/ Pigott R, Dillon LP, Hemingway JH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187: 584-589.
- /4/ Martin S. Lösliche Formen von Adhäsionsmolekülen. Wege für Diagnostik und Therapie, *Dt. Ärzteblatt* 1995; 92: A-2984-2990.
- /5/ Pastore L, Tessitore S, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999; 100: 1646-1652.

- /6/ Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. *Circulation* 1997; 96: 4219-4225.
- /7/ Moriska N, Saito I, Tamura K, Tashiro J, Masuda M, Kanzaki T, Watanabe S, Masuda Y, Saito Y. New indices of ischemic heart disease and aging: studies on the serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with hypercholesterolemia and ischemic heart disease. *Atherosclerosis* 1997; 131: 43-48.
- /8/ Ferri C, Desideri G, Baldoncini R, Bellini C, De Angelis C, Mazzochi C, Santucci A. Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities. *Diabetes* 1998; 47: 660-667.
- /9/ Wenzel K, Ernst M, Rohde K, Baumann K, Speer A. DNA polymorphism in adhesion molecule genes – a new risk factor for early atherosclerosis. *Hum. Genet.* 1996; 97: 15-20.
- /10/ Dräger LJ, Julius U, Kraenzle K, Schaper J, Toepfer M, Zygan K, Otto V, Steinhagen-Thiessen E. DALI – the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28: 994-1002.
- /11/ Richter V, Wagner OF, Rassoul F. Circulating cell adhesion molecules in patients with risk factors for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 144 (1): 56.
- /12/ Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A, Marraccini P, Protera C, Sassi G, Taddei M, Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96: 1381-1385.
- /13/ Hackman A, Abe Y, Insull W, Pownall H, Smith L, Dunn K, Gotto AM, Ballantyne CM. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996; 93: 1334-1338.

- /14/ Peter K, Nawrot P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kübler W, Bode C. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 505-512.
- /15/ Chen N-G, Holmes M, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, soluble adhesion molecules, and mononuclear cell binding in healthy volunteers. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1999; 84: 3485-3489.
- /16/ Adams MR, Jessup W, Celermajer DS. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: Reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29: 491-497.
- /17/ Bergmann S, Siekmeier R, Mix C, Uhlig K, Richter P, Jaross W. Einfluß moderaten Zigarettenrauchens auf die zirkulierenden Monozytenpopulationen und ICAM-1 bei Frauen im mittleren Lebensalter. In: Die Bedeutung von Proteoglykanen, Lipoproteinen und Lipiden für die Atherogenese, Hrsg.: Heinle H, Schulte H, Siegel G, Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart 1998, S. 175-179.
- /18/ Richter V, Kuntze Th, Kroker A, Purschwitz K, Rassoul F. Lipoproteinprofil, Parameter der Lipidperoxidation und zirkulierende Zelladhäsionsmoleküle bei „normolipämischen“ Koronarsklerose-Patienten. In: Die Bedeutung von Proteoglykanen, Lipoproteinen und Lipiden für die Atherogenese, Hrsg.: Heinle H, Schulte H, Siegel G, Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart 1998, S. 195-199.
- /19/ Fasching P, Veitl M, Strelci C, Schneider B, Waldhäusl W, Wagner OF. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association of microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol.* 1996; 81: 4313-4317.
- /20/ Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Campagnola M, Davoli A, Rigoni A, Zenti MG, Pastorino AM, Cascio VL. E-selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: possible role of oxidative stress. *Diabetologia* 1997; 40: 584-589.

- /21/ De Mattia G, Bravi MC, Costanzo A, Laurenti O, Cassone Faldetto M, Armiento A, De Luca O, Ferri C. Effects of insulin on in vitro vascular cell adhesion molecule-1 expression and in vivo soluble adhesion molecule-1 expression and in vivo soluble VCAM-1 release. *Diabetologia* 1999; 42: 1235-1239.
- /22/ Richter V, Rassoul F, Wagner OF, Reuter W, Kuntze Th. Soluble cell adhesion molecules in patients with hyperlipidemias and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1999; 147 (Suppl. 2): S 31.